



**Etude fonctionnelle d'une protéine associée aux
microtubules du fuseau mitotique chez la plante
Arabidopsis thaliana: atMAP65-4**

Vincent Fache

► **To cite this version:**

Vincent Fache. Etude fonctionnelle d'une protéine associée aux microtubules du fuseau mitotique chez la plante *Arabidopsis thaliana*: atMAP65-4. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT: 2011GRENV004 . tel-00588242

HAL Id: tel-00588242

<https://theses.hal.science/tel-00588242>

Submitted on 22 Apr 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Vincent FACHE

Thèse dirigée par **Marylin VANTARD**

préparée au sein du **Laboratoire de physiologie cellulaire et végétal**

dans l'**École Doctorale de Chimie et Science du Vivant**

Etude fonctionnelle d'une protéine associée aux microtubules du fuseau mitotique chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* : AtMAP65-4.

Thèse soutenue publiquement le **3 février 2011**,
devant le jury composé de :

M^{me} Annie ANDRIEUX

Directeur de recherche, G.I.N., Grenoble Président

M^r Denis CHRETIEN

Directeur de recherche, I.C.M., Rennes Rapporteur

M^r Bruno FAVERY

Directeur de recherche, I.B.S.V., Sophia Antipolis Rapporteur

M^r Carsten YANKE

Directeur de recherche, S.N.C., Paris Examineur

M^{me} Marylin VANTARD

Directeur de recherche, L.P.C.V., Grenoble Membre



Remerciements

Je remercie Marilyn Vantard qui m'a encadré durant ces années de thèse et a partagé avec moi ses compétences techniques et fondamentales avec rigueur et passion. Directrice du laboratoire, elle a consacré un temps précieux à l'avancée de mon projet.

Je remercie tout particulièrement Jérémie Gaillard qui m'a transmis les savoirs faire clés nécessaires à l'étude des MAP65s d'*Arabidopsis*. Pédagogue, il a fait preuve d'une grande patience pour me permettre de perfectionner mes aptitudes en biochimie, biologie moléculaire et cellulaire. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec lui pour son sens de la manipulation en toutes circonstances, sa bonne humeur et nos discussions sur tous les sujets!

Merci à Virginie Stoppin-Mellet avec qui j'ai beaucoup appris en mettant au point le système d'observation en temps réel de polymérisation des microtubules. Ensuite nous avons partagé nos difficultés devant l'outil informatique nécessaire à la modélisation de l'activité des protéines d'intérêt. A deux ces obstacles ont été plus faciles à franchir !

Mes remerciements s'adressent à Jean-Louis Martiel qui a mis en place le programme de simulation numérique de l'activité des MAP65s. Grâce à Jean-Louis, les concepts physiques et mathématiques utilisés dans le programme ne nous sont plus abstraits.

Merci à Laurent Blanchoin, chef d'équipe de Physique du cytosquelette et de la morphogenèse, pour son implication auprès des étudiants et le dynamisme qu'il transmet au groupe.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe et du laboratoire pour leur sympathie et avec qui j'ai passé des années très agréables. Un merci tout particulier aux étudiants avec qui nous avons partagé nos difficultés mais aussi et surtout de très bons moments !

Merci Cristian, Anne-Cécile, Didier, Christophe, Karen, Matthieu, Zong, Djeneb, Daniel, Edwige, Manu etc !

Je remercie également ma famille et mes amis pour leur soutien infailible tout au long de cette aventure.

SOMMAIRE

Principales abréviations	3
Introduction	5
1. Les microtubules	6
1.1 Synthèse et modifications du dimère α / β de tubuline	6
1.2 Structure des microtubules	9
1.3 Propriétés et structure de l'hétérodimère de tubulines	10
1.4 Cinétique d'assemblage de la tubuline <i>in vitro</i>	11
1.5 Dynamique des MTs à l'état stationnaire	13
2. Distribution des réseaux de microtubules au cours du cycle cellulaire de plantes	19
2.1 L'interphase	20
2.2 La transition vers la mitose	24
2.3 L'entrée en mitose	24
2.4 La transition métaphase / anaphase	28
2.5 L'anaphase	28
2.6 La sortie de mitose	29
3. Les protéines associées aux microtubules (MAPs)	30
3.1 Les protéines nucléatrices de MTs	30
3.2 Les protéines impliquées dans l'assemblage/l'organisation des MTs	31
3.3 Protéines responsables de la déstabilisation des MTs	34
3.4 Protéines impliquées dans la formation de faisceaux de MTs	35
3.5 Le cas particulier des kinésines	36
4. L'étude des <i>At</i> MAP65s	37
4.1 Caractérisation des MAP65s chez <i>Arabidopsis</i>	37
4.2 <i>At</i> MAP65-4 une MAP à part	42
Objectifs de la thèse	44
I Etude des propriétés moléculaires et fonctionnelles d'<i>At</i>MAP65-4	46
1. Introduction	46
2. Résumé de l'article de recherche	46
3. Article de recherche	47
4. Conclusion et perspectives	65

II Etude de la phosphorylation d'AtMAP65-4 par les kinases Auroras	70
1. Introduction	70
2. Résultats	73
2.1 Tests de phosphorylation <i>in vitro</i>	73
2.2 Etude de l'effet de la phosphorylation d'AtMAP65-4 <i>in vivo</i>	78
3. Discussion	81
III Modélisation de l'activité d'AtMAP65-4	86
1. Introduction	86
2. Résumé de l'article de recherche	89
3. Article de recherche	90
4. Conclusion et perspectives	124
Conclusions et perspectives	126
Matériels et méthodes	130
1. Production d'AtMAP65-4 recombinante et sa purification	130
2. Tests d'activité d'AtMAP65-4 <i>in vitro</i>	132
3. Suivi de cinétique de polymérisation de la tubuline en présence de MAP par TIRFm	133
4. Test de phosphorylation d'AtMAP65-4 par les kinases AtAuroras	135
5. Etude de la phosphorylation d'AtMAP65-4 par les kinases AtAuroras	137
Références bibliographiques	142
Annexes	152

Principales abréviations

ADNc	ADN complémentaire
ADN-T	ADN de transfert
CDK	kinase dépendante des cyclines
DTT	dithiothréitol
GTP	guanosine tri-phosphate
H3	Histone 3
KDa	kilo Daldon
KO	"Knock-Out"
LB	Luria Broth
MAP	protéine associée aux microtubules
min	minute
mM	mili molaire (10^{-3}M)
MT	microtubule
nm	nano mètre (10^{-9}m)
pb	paires de bases
s	seconde
SDS	sodium-dodécyl-sulfate
μm	micro mètre (10^{-6}m)
μM	micro molaire (10^{-6}M)

Nomenclature

<i>AtMAP65-4</i>	protéine sauvage d' <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>AtMAP65-4</i>
<i>AtMAP65-4</i>	gène sauvage codant pour la protéine <i>AtMAP65-4</i>
<i>Atmap65-4</i>	allèle muté du gène <i>AtMAP65-4</i> , le gène est interrompu par un ADN-T

Introduction

La morphogenèse cellulaire est la coordination de chacun des éléments constituant la cellule afin de lui donner une architecture qui va permettre sa fonction dans l'organisme. Les cellules eucaryotes utilisent le cytosquelette et ses propriétés dynamiques, comme acteur majeur de la morphogenèse. Dans les cellules animales, le cytosquelette est composé de microtubules (MTs), de filaments intermédiaires et de microfilaments d'actine. Dans les cellules de plantes, la présence de filaments intermédiaires n'a pas été observée.

Les éléments du cytosquelette sont présents sous forme de polymères qui résultent de l'assemblage de briques élémentaires. Ces éléments sont distribués comme éléments isolés et associés à des protéines ou associés entre eux par un maillage de protéines impliquant la formation de réseaux. Le cytosquelette est, contrairement à ce que le nom suggère, une structure hautement dynamique où ses composants se réorganisent au cours de la vie de la cellule. Les fonctions du cytosquelette sont multiples, il soutient des fonctions vitales telles que la mobilité cellulaire, le trafic intracellulaire tel que le déplacement d'organites, la division cellulaire ou encore le maintien de la structure cellulaire. La construction et la régulation du cytosquelette sont assurées par une grande variété de protéines qui lui sont associées. Dans ce contexte, le but de mon travail de thèse a été d'étudier chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, le rôle d'une protéine associée au cytosquelette de microtubules, AtMAP65-4 dans l'organisation et les fonctions de réseaux de MTs au cours du cycle cellulaire.

Dans l'introduction, je débiterai par la description de la synthèse de la tubuline et de ses propriétés structurales, puis de ses propriétés d'auto-assemblage en MTs *in vitro* et des propriétés structurales de cette nouvelle entité formée. En effet, les MTs possèdent un comportement dynamique spécifique que nous étudierons en détail. Ensuite, nous examinerons l'organisation des MTs et leurs fonctions associées au sein de la cellule végétale. Les rôles des différentes classes de protéines associées aux MTs seront développés. Enfin, nous focaliserons notre étude sur une famille de Protéines Associées aux Microtubules (MAPs) présente chez *Arabidopsis thaliana* : les AtMAP65s.

1. Les microtubules

Présents dans les cellules eucaryotes, les microtubules sont des cylindres creux de 25 nm de diamètre issus de l'arrangement bidimensionnel de la tubuline qui génère une pseudo-hélice. Les propriétés mécaniques remarquables des MTs sont mises à profit par la cellule afin d'assurer des fonctions vitales. Des études *in vitro* permettent de mieux définir les caractéristiques de ce polymère capable de s'auto-assembler.

1.1 Synthèse et modifications du dimère α / β de tubuline

Sept tubulines ont été identifiées jusqu'ici: les tubulines α , β , γ , δ , ϵ , ζ et η dont les fonctions pour certaines restent encore mal définies. Ainsi, la tubuline δ pourrait être impliquée dans la mise en place du flagelle chez l'algue unicellulaire *Chlamidomonas reinhardti*. La tubuline η est indispensable à la duplication des corps basaux (équivalent des centrioles) chez la paramécie et les tubulines ϵ et ζ ont été identifiées dans des banques de données de séquences mais ne possèdent pas de fonctions connues (pour revue : Dutcher, 2001). Les fonctions des tubulines α , β et γ sont mieux connues. La tubuline γ est impliquée lors de la phase de nucléation des MTs, l'étape initiatrice d'assemblage (Oakley *et al.*, 1990). Les tubulines α et β ne sont jamais présentes individuellement dans le cytoplasme des cellules, mais s'associent exclusivement en hétérodimères de tubuline α - tubuline β qui constituent les briques élémentaires qui s'assemblent pour former le MT. Les tubulines α et β sont des protéines globulaires, d'un poids moléculaire de 55kDa. Elles présentent un point isoélectrique (pI) proche de 5,5 leur conférant des propriétés acides.

Il existe plusieurs gènes codant pour les tubulines α et β et leur nombre est variable selon les espèces (6 gènes variants codant pour les tubulines α et 9 pour les tubulines β chez *Arabidopsis*, 6 à 8 gènes variants codant pour chaque tubuline chez les vertébrés) et leur conservation à travers l'arbre phylogénétique est remarquable (plus de 75% des résidus sont identiques entre une isoforme de tubuline de plante et son homologue humaine). La plupart de ces gènes ont une expression ubiquitaire mais certains sont exprimés dans un organe spécifique (Raff, 1994), ou leur expression est régulée au cours du développement : chez les plantes supérieures les différentes copies des gènes codants pour les tubulines α et β sont exprimés séquentielles au cours du développement (Hussey *et al.*, 1988 ; Carpenter *et al.*, 1992). De plus, des études génétiques ont permis de montrer, notamment, chez la levure et la drosophile, que certains gènes de tubuline sont interchangeable alors que pour d'autres, une

compensation est impossible (Schatz *et al.*, 1986 , Raff *et al.*, 1997).

Plusieurs paramètres influencent l'expression des gènes des tubulines α et β . La micro-injection de dimères de tubuline dans le cytoplasme de cellules de mammifères induit un rétrocontrôle de la quantité d'ARNm de tubulines α et β (Cleveland and Havercroft, 1983). Ces données indiquent que la quantité de tubuline présente dans le cytosol des cellules influence l'expression des gènes codant pour les tubulines α et β . De plus, la quantité de tubuline présente dans le cytosol est tributaire de l'architecture du cytosquelette microtubulaire qui, en se réarrangeant, modifie la quantité de tubuline disponible (Cleveland, 1989). Par ailleurs, la synthèse des deux sous-unités est coordonnée. Si le nombre de copies du gène de la tubuline β est augmenté, un contrôle post-traductionnel se met en place, induisant la dégradation de la protéine (Whitfield *et al.*, 1986). Enfin, il existe un contrôle transcriptionnel qui coordonne les niveaux d'expression des gènes : si l'expression du gène de la tubuline α est augmentée de manière artificielle, alors l'expression du gène de la tubuline β sera augmentée (Gonzalez-Garay and Cabral, 1995). Dans la cellule, ces différents contrôles permettent de conserver une stœchiométrie équivalente entre tubulines α et β .

Après traduction, la structure de la tubuline doit être repliée pour lui conférer sa forme globulaire. Cette étape nécessite de l'ATP, du GTP, la présence d'un complexe chaperon et de 6 « tubulin folding » cofacteurs (TFC-A, TFC-B, TFC-C, TFC-D, TFC-E et ARL2). Ces protéines régulent à la fois la synthèse des sous-unités, la formation de l'hétérodimère et aussi la stabilité du MT. Des travaux de génétique ont mis en évidence l'importance des cofacteurs lors du développement d'*Arabidopsis*, particulièrement lors des étapes du développement du zygote et des trichomes (pour revue : Szymanski, 2002).

Lors de l'assemblage des MTs, l'extrémité C-terminale de la tubuline devient exposée à la surface du MT. C'est ainsi un site privilégié de liaison pour de nombreuses protéines associées aux MTs ou MAPs (« *Microtubule associated proteins* ») et des moteurs moléculaires. L'extrémité C-terminale de la tubuline peut être le siège d'un grand nombre de modifications post-traductionnelles : polyglutamylation, polyglycylation et tyrosination. En dehors de son extrémité C terminale, la tubuline est sujette à d'autres modifications post traductionnelles comme la phosphorylation ou l'acétylation. Ces modifications sont conservées au cours de l'évolution et on pense qu'elles agissent de manière individuelle ou en combinaison afin de contrôler les mécanismes cellulaires médiés par les MTs, par exemple en altérant le recrutement de moteurs moléculaires ou d'autres protéines se liant à la tubuline. Les enzymes responsables de ces modifications sont pour certaines encore mal connues.

Les réactions de glutamylation et de glycylation génèrent respectivement des chaînes latérales de résidus glutamate et glycine de longueurs variables, au niveau de glutamates présents dans l'extrémité C-terminale des tubulines α et β (pour revue : Verhey and Gaertig, 2007). La glycylation est majoritairement rencontrée sur la tubuline d'axonème (cil et flagelle) tandis que la glutamylation est présente dans les cellules neurales, les centrioles, les axonèmes et avec des MTs du fuseau mitotique (Hammond *et al.*, 2008). Dans des cellules humaines, les travaux de Lacroix et al., (2010) ont démontré récemment un lien direct entre la présence de longues chaînes latérales de glutamate sur des MTs, et la stimulation de leur fragmentation par une protéine de fragmentation des MTs, la spastine.

Le cycle de tyrosination – détyrosination de la tubuline α est le mieux documenté (pour revues, Lafanechere and Job, 2000, Westermann and Weber, 2003 et Hammond *et al.*, 2008). La détyrosination implique le détachement de la tyrosine C-terminale de la tubuline α par une carboxypeptidase qui reste inconnue jusqu'ici. L'acide aminé terminal est alors un glutamate. La tubuline tyrosine ligase (TTL) est responsable de la réaction d'ajout de tyrosine, ou tyrosination. Cette réaction s'effectue lorsque le dimère de tubuline est individualisé. Ce cycle de tyrosination – détyrosination permet de recruter de manière différentielle des moteurs moléculaires et des protéines de bout (+). Par exemple, les travaux de Dunn *et al.*, (2008) réalisés dans des cellules de mammifères suggèrent que la kinésine 1 se lie et se déplace préférentiellement le long de MTs détyrosinés. Par ailleurs, la tyrosination de MTs peut participer au recrutement de protéines de bout (+) notamment la protéine CLIP-170 comme cela a été démontré par Bieling *et al.*, (2008). En ce qui concerne la détyrosination des MTs, Peris *et al.*, (2009) ont montré qu'elle diminue l'activité de dépolymérisation de MTs par des kinésines de la famille 13, dont MCAK. Les MTs sont alors stabilisés de manière indirecte. De plus, l'importance du cycle de tyrosination-détyrosination a été montré dans les processus de tumorigenèse et de croissance neuronale (pour revue : Lafanechere and Job, 2000).

La phosphorylation de la tubuline β a été rapportée en amont de l'extrémité C-terminale lors de la mitose de cellules de mammifère (Fourest-Lieuvin *et al.*, 2006). La phosphorylation pourrait ainsi réguler la dynamique des MTs pendant la division cellulaire.

L'acétylation de la lysine 40 de la tubuline α est particulière car ce résidu est prédit comme étant exposé vers la lumière du MT. Ce processus réversible est mal connu. L'enzyme responsable de l'acétylation est inconnu mais au moins deux enzymes ont démontré une activité déacétylase de la tubuline *in vitro* et *in vivo* (Hammond *et al.*, 2008).

En conclusion, la diversité intrinsèque des gènes codants pour la tubuline est amplifiée par la multiplicité des modifications post-traductionnelles.

1.2 Structure des microtubules

Des observations de MTs en microscopie électronique à transmission ont révélé que les MTs sont généralement composés de 13 protofilaments linéaires et assemblés en parallèle. Les protofilaments s'organisent autour d'une lumière et confèrent la structure en tube creux du MT (Figure 1). Chaque protofilament correspond à l'alternance de dimères de tubuline α - β . Des observations en cryomicroscopie de la structure de MTs (Mandelkow and Mandelkow, 1985, Chretien *et al.*, 1992) ont permis de montrer que les dimères s'agencent côte à côte sous forme d'hélice qui parcourt la totalité du MT avec un pas de 12 nm (Metoz *et al.*, 1997). Un micromètre de MT est constitué de 1625 hétérodimères de tubuline. Du fait du nombre de protofilaments, l'arrangement des sous-unités ne peut pas être décrit par une hélice continue. En effet, on observe des discontinuités qui s'alignent selon un axe appelé ligne de suture parallèle à l'axe du MT (Mandelkow and Mandelkow, 1985, Kikkawa *et al.*, 1994). Cette suture constitue une zone particulière du MT car elle met en contact de la tubuline α avec de la tubuline β .

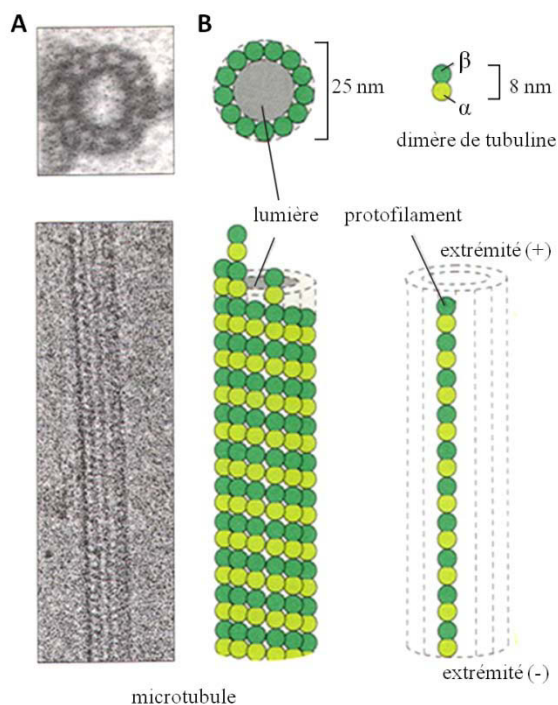


Figure 1 : Structure des microtubules.

- (A) Observation d'un MT en cryomicroscopie : coupe transversale montrant la lumière du MT autour de laquelle s'organisent les protofilaments ; coupe longitudinale montrant les protofilaments parallèles.
- (B) Représentation schématique d'un MT : les dimères de tubulines s'agencent sous forme d'hélice en parcourant la totalité du MT avec un pas de 12 nm. L'extrémité (+) du MT expose la tubuline β alors que l'extrémité (-) expose des sous unités de tubuline α . Adapté de Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 3è édition.

La structure des hétérodimères et leur assemblage particulier confère au MT une polarité structurale : l'extrémité (+) du MT expose la tubuline β alors que l'extrémité (-) expose des sous unités de tubuline α . *In vivo*, les MTs sont nucléés à partir d'un complexe de nucléation composé de tubuline γ . L'extrémité localisée au site de nucléation correspond à l'extrémité (-), l'extrémité (+) étant distale. Dans les cellules animales, la tubuline γ est localisée aux centrosomes, centres organisateurs de MTs.

1.3 Propriétés et structure de l'hétérodimère de tubulines

L'hétérodimère de tubulines possède une activité GTPasique. Chaque sous-unité est capable de lier une molécule de GTP. Le GTP lié à la sous unité α n'est pas hydrolysable alors que celui présent sur la sous-unité β est hydrolysable au niveau d'un site de liaison dit échangeable (Linse and Mandelkow, 1988). Le GTP échangeable est lié à la tubuline avec une affinité de l'ordre de 10 ou 100 nM en présence ou en absence respectivement de magnésium (pour revue : Dustin, 1984). Ce site est capable de lier du GDP mais avec une affinité d'environ trois fois plus faible que pour le GTP (Dustin, 1984). Ainsi, la présence sur la tubuline β du site de GTP échangeable confère une polarité structurale à l'hétérodimère α - β . En 1993, Mitchison a proposé que l'extrémité (+) du MT expose la tubuline β tandis que l'extrémité (-) expose uniquement la tubuline α (Mitchison, 1993).

La résolution de la structure cristalline de l'hétérodimère de tubulines s'est heurtée au problème de polymérisation de la tubuline. Les études cristallographiques par diffraction de rayons X, sont jusqu'ici difficile à mener du fait de l'hétérogénéité de formes et d'organisation des MTs en solution. Dans le but de contourner cette limitation, Nogales *et al.* (1998) ont polymérisé de la tubuline en présence de Zn^{2+} , qui inhibe l'assemblage de la tubuline en MT et favorise son assemblage en feuillet bidimensionnel. Profitant de cette particularité, la structure cristalline de ce feuillet a été analysé par cristallographie électronique qui a permis d'obtenir une structure de la tubuline avec une précision de 3.5 Å (Nogales *et al.*, 1998b). Cette structure tridimensionnelle est très proche de FtsZ. FtsZ est la tubuline ancestrale présente chez les procaryotes (Lowe and Amos, 1998) et elle possède une faible homologie de séquence avec la tubuline.

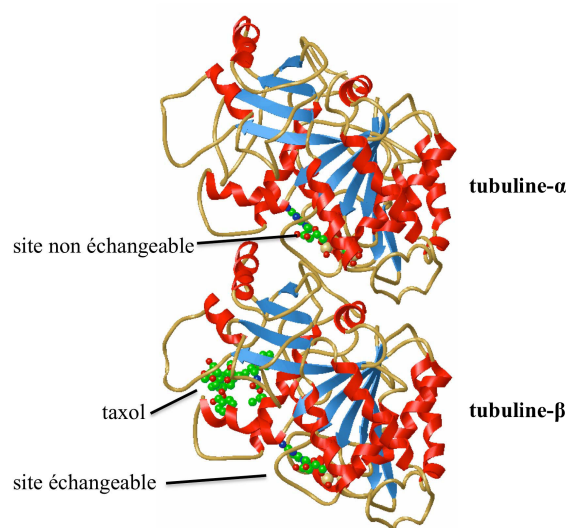


Figure 2 : Structure de la tubuline.

Structure tridimensionnelle de l'hétérodimère de tubulines. Les hélices α sont représentées en rouge et les feuillets β en bleu. L'homologie de structure est très grande pour les tubulines α et β dont l'homologie de séquence protéique est de 50%.

Les sites de fixation au GTP sont représentés en vert, de même que le site de fixation du taxol (drogue stabilisant les microtubules).

(Nogales *et al.*, 1998a)

La résolution de la structure tridimensionnelle de l'hétérodimère α - β a révélé une architecture globulaire composée de 12 hélices α et de 10 feuillets β (Nogales *et al.*, 1998b), (Figure 2). Cette structure a permis d'établir un modèle à très haute résolution des MTs et de localiser la présence du site échangeable du GTP exposé sur la sous-unité de tubuline β à l'interface entre 2 dimères. Les auteurs ont obtenu la confirmation de la présence de sous-unité de tubuline β à l'extrémité (+) des MTs. Enfin le mécanisme d'action de drogues dirigées contre les MTs peut être mieux appréhendé grâce à cette structure, notamment la fixation du taxol (Nogales *et al.*, 1998a).

1.4 Cinétique d'assemblage de la tubuline *in vitro*

La polymérisation de la tubuline est depuis longtemps un vaste champ d'exploration pour les biochimistes. *In vitro*, en présence de GTP, la tubuline est capable de s'auto-assembler en MTs à partir d'une concentration minimale appelée concentration critique à l'assemblage. Cette concentration, de l'ordre de 20-30 μ M va varier selon les conditions expérimentales et la qualité de la tubuline purifiée. La polymérisation de la tubuline se décrit en trois phases distinctes : une phase de nucléation pendant laquelle de courtes amorces de MTs se forment, puis une phase d'élongation qui va accroître la longueur des polymères jusqu'à l'établissement d'un état stationnaire pour lequel la masse de MTs reste constante bien que les MTs restent dynamiques.

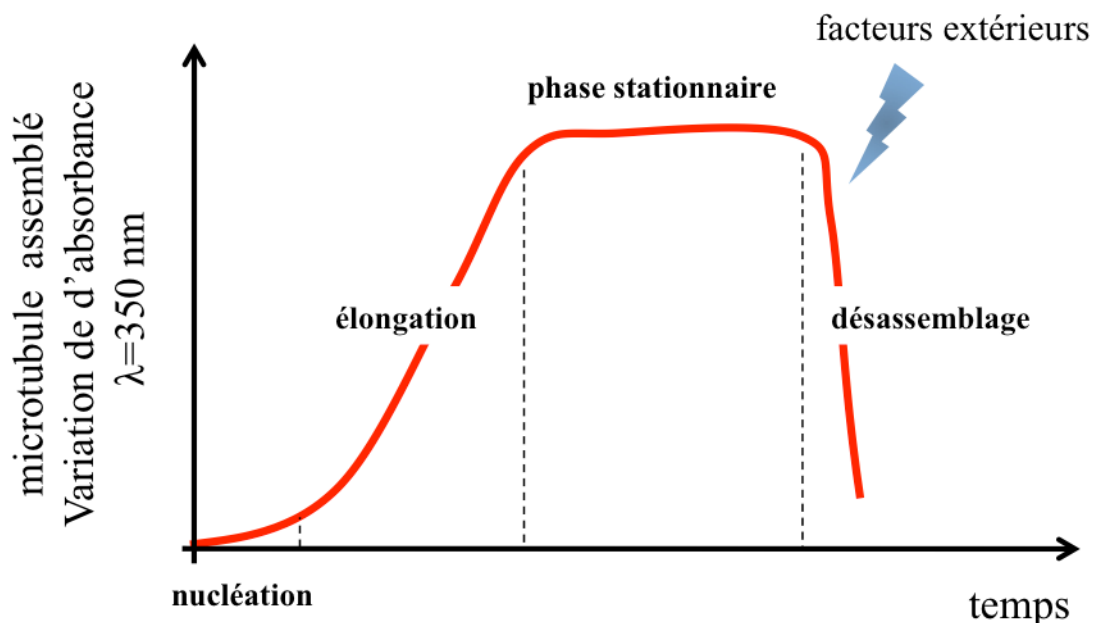


Figure 3 : Cinétique d'assemblage de MTs suivi en spectrométrie.

La turbidité de la solution est suivie à 350 nm. Les différentes phases se succèdent dans le temps : nucléation, élongation, phase stationnaire et une phase éventuelle de désassemblage, en présence d'agents déstabilisants (froid, drogues, dilution...). Pendant la phase stationnaire, les microtubules restent dynamiques. Leur comportement est régi par l'effet tapis roulant ou « *treadmilling* » et/ou l'instabilité dynamique.

➤ la nucléation :

La nucléation est la première étape d'assemblage du MT. Elle permet l'organisation de dimères de tubulines en courtes amorces de MTs. Cette phase est dépendante de la concentration en tubuline qui doit être supérieure à la concentration critique d'assemblage *in vitro*. Dans un premier temps, les dimères de tubulines se rencontrent pour former des oligomères ou des protofilaments (Figure 4). La présence de telles structures a été observée notamment par des observations en microscopie électronique (Erickson, 1974 ; Kirschner *et al.*, 1975 et Job *et al.*, 2003). La formation d'oligomères s'accompagne d'une hydrolyse de GTP (Melki and Carlier, 1993). Ensuite, ces oligomères ou protofilaments s'associent de façon transitoire en feuillets plans de plus en plus grands jusqu'à ce qu'ils soient capables de se replier en MTs. Dans cette hypothèse, le repliement du feuillet se déroule le long de la ligne de suture du MT (Chretien *et al.*, 1995). Cette étape de nucléation ne peut se réaliser qu'en présence de tubuline GTP. Des essais avec de la tubuline GDP n'ont pas permis de générer d'oligomères (Valiron *et al.*, 2010).

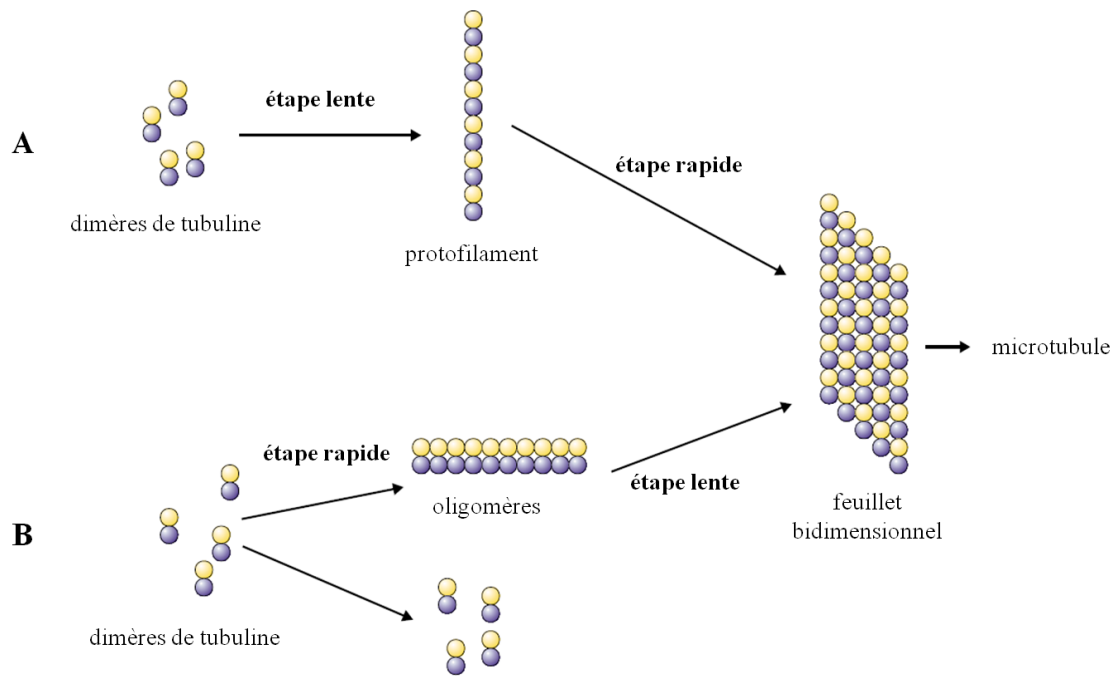


Figure 4 : Modèles de nucléation de microtubules *in vitro*.

- A. Les dimères de tubulines s'associent pour former un protofilament suivant une réaction limitante lors de la cinétique de formation du MT. Les étapes de formation d'un feuillet bidimensionnel et son repliement en MT sont rapides.
- B. Les dimères de tubulines s'excluent en 2 catégories : une partie des dimères vont rester libres tandis que d'autres s'associent en oligomères. La cinétique de formation d'oligomères est rapide mais plusieurs oligomères doivent fusionner, lors d'étapes lentes, pour créer le feuillet de tubuline à l'origine du MT (Job *et al.*, 2003)

➤ L'élongation :

Les oligomères de tubuline voient leur longueur s'accroître avec la polymérisation de dimères de tubulines à leurs extrémités. La vitesse d'ajout de sous-unités est décrite par la loi d'action de masse qui prédit une vitesse d'association des dimères qui dépend essentiellement de la concentration de tubuline GTP disponible (Walker *et al.*, 1988).

Des études en cryomicroscopie électronique ont permis d'étudier la forme des MTs lors de leur élongation. Les travaux de Mandelkow *et al.*, (1991) mettent en évidence des extrémités franches avec des extensions de quelques protofilaments. Ces observations suggèrent une addition de dimères de tubulines le long des protofilaments pour expliquer l'allongement des MTs. Par la suite, Chretien *et al.*, (1995) ont observé des MTs présentant un feuillet plan à l'extrémité en croissance. La longueur du feuillet est dépendante de la concentration en tubuline GTP disponible. Ces auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle, au voisinage de la

concentration critique de tubuline, le repliement du feuillet est rapide, et le MT expose une extrémité franche. Ainsi, l'élongation des MTs se réaliserait en 2 étapes : l'addition de dimères à l'extrémité en croissance créerait un feuillet courbe qui se replierait naturellement ensuite en tube le long de la ligne de suture du MT.

➤ Etat stationnaire :

La masse de tubuline sous forme polymérisée atteint un plateau mais cela ne traduit pas un état statique des MTs. Bien au contraire, lors de cette phase, la dynamique des MTs peut être régie par 2 mécanismes: l'effet tapis roulant (ou « treadmilling ») ou le comportement d'instabilité dynamique (cf. 1.5 Dynamique des MTs à l'état stationnaire). Ces comportements maintiennent constant la concentration de tubuline disponible.

Une étape de désassemblage des MTs peut intervenir en réponse à un facteur extérieur (froid, dilution, ajout de drogues inhibitrices de la polymérisation ou déstabilisatrices des MTs) ou à un épuisement du GTP. Mais si les conditions redeviennent favorables, les MTs peuvent à nouveau entrer dans une phase d'élongation.

La polymérisation de MTs *in vitro* frappe par son caractère rectiligne, en effet si le diamètre d'un MT n'est que de 25 nm, sa longueur totale peut atteindre plusieurs dizaines de micromètres! Des études physiques ont permis de mesurer la longueur de persistance des MTs. Pour cela, Venier *et al.*, (1994) ont notamment appliqué des contraintes, sous forme de différents flux aux MTs, les obligeant ainsi à se courber. La rigidité intrinsèque des MTs explique alors à elle seule la forme adoptée pour contre balancer les stress extérieurs. Par cette approche et une approche statique, basée sur la fluctuation thermique des MTs, ces auteurs ont mesuré une longueur de persistance des MTs d'environ 2 millimètres.

1.5 Dynamique des MTs à l'état stationnaire :

L'étude de la dynamique des MTs à l'état stationnaire a permis de mettre en évidence 2 mécanismes majeurs : l'effet tapis roulant et le comportement d'instabilité dynamique.

1.5.1 L'effet tapis roulant ou « *treadmilling* »

L'incorporation de dimères de tubulines à l'extrémité plus et la dissociation de dimères à l'extrémité moins génère un flux de tubuline dans le MT appelé effet tapis roulant ou « *treadmilling* ». Selon ce mécanisme, l'état du nucléotide associé à la tubuline (GTP ou GDP) ainsi que la concentration en tubuline modulent les constantes d'association (k^+) et de dissociation (k^-) aux deux extrémités du MT. Ainsi, l'effet *treadmilling* est observé à une certaine concentration où, à l'échelle globale du MT, de la tubuline s'associe à l'extrémité (+) et compense la dissociation de la tubuline à l'extrémité (-). Cette différence de comportement est à l'origine d'un flux de dimères de tubulines de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) du MT (Margolis, 1981). Cet effet avait déjà été identifié en 1976 pour les microfilaments d'actine (Wegner, 1976). Ce modèle prédit l'absence de changement du nombre de MTs. L'importance physiologique du mécanisme de tapis roulant a longtemps été sous-estimé avant que des observations directes *in vivo* ne confirment son existence et son rôle dans la régulation de l'organisation des MTs de cellules animales (Rodionov and Borisy, 1997). Par des approches d'imagerie cellulaire, dans les cellules de plantes en interphase, un mécanisme de *treadmilling* hybride a été identifié et permet le déplacement de courts MTs dans le cortex cellulaire (Shaw *et al.*, 2003). C'est un comportement mixte qui présente des caractéristiques de l'effet tapis roulant avec un comportement d'instabilité dynamique résiduel.

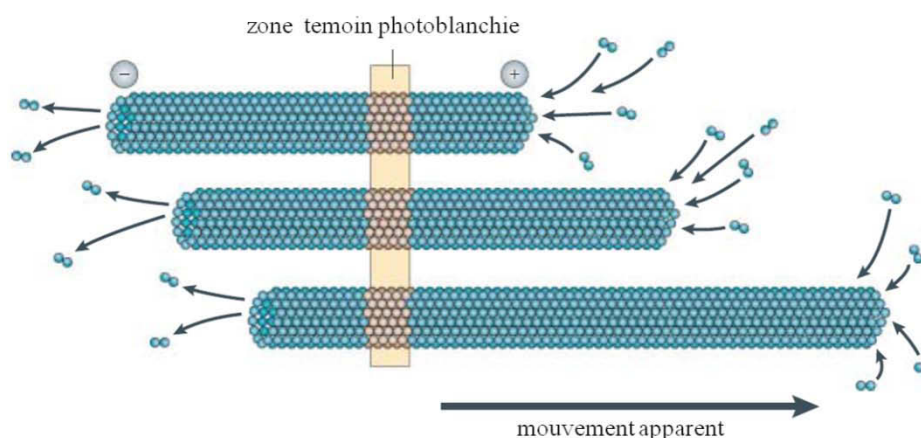


Figure 5 : Comportement dynamique des MTs à l'état stationnaire.

L'effet tapis roulant ou « *treadmilling* » est observé lorsque des dimères s'assemblent à l'extrémité (+) du MT alors que des dimères se désassemblent en même proportions à l'extrémité (-). Ce mécanisme génère un flux de dimères de tubulines de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) (Lloyd and Chan, 2004).

1.5.2 Le comportement d'instabilité dynamique

Mitchison et Kirschner ont été les premiers à étudier de manière intensive la longueur des MTs et la distribution de leur nombre à l'état stationnaire *in vitro* (Mitchison and Kirschner, 1984). Ils ont montré que pour une masse de polymère donnée, le nombre de MTs diminue dans le temps alors que leurs longueurs augmentent. Ainsi, ils ont suggéré que chaque MT pouvait s'allonger ou se raccourcir de manière aléatoire. Horio and Hotani, (1986) ont ensuite effectués les premières mesures qui ont confirmé le dynamisme des MTs à l'état stationnaire. Les données rassemblées montrent que les extrémités (+) et (-) des MTs alternent entre des phases de croissance et de raccourcissement de manière aléatoire.

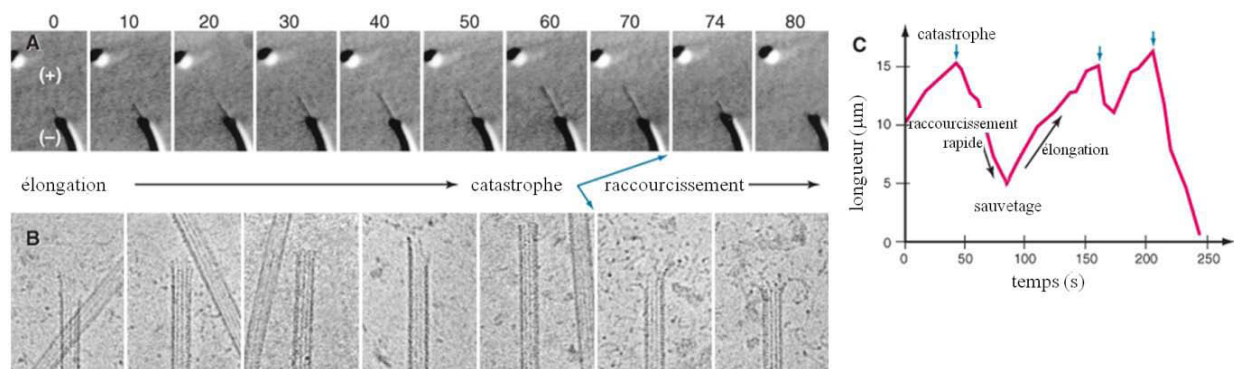


Figure 6 : Comportement d'instabilité dynamique des MTs.

- (a) Observation par contraste interférentiel de type « Nomarski » (DIC) de la polymérisation d'un MT issu de l'extrémité (+) brisée d'un axonème (partie axiale et motrice d'un cil ou d'un flagelle d'une cellule eucaryote). Un événement de catastrophe ($t=70s$) entraîne la dépolymérisation rapide du MT (Walker *et al.*, 1988).
- (b) Cryomicroscopie de MTs en phase de croissance et de raccourcissement. Les MTs en phase de croissance ont une extrémité franche ou oblique. Dans le cas d'une extrémité oblique, le feuillet de tubuline ne s'est pas encore replié en MT. Les MTs en raccourcissement présentent des protofilaments et feuillets courbés qui se déroulent le long du MT (Mandelkow *et al.*, 1991).
- (c) Fluctuation de la longueur de l'extrémité (+) d'un MT mesuré lors du suivi de la cinétique d'assemblage à l'état stationnaire. Mesures issues d'une expérience similaire à celle décrite en (a), (Erickson and O'Brien, 1992).

Les différents paramètres cinétique d'assemblage des MTs *in vitro* ont été mesurés pour une concentration de 20 μM de tubuline et ont révélées des différences de comportement aux 2 extrémités des MTs, notamment lors des phases de polymérisation: les vitesses mesurées sont de près de 2 fois plus grande à l'extrémité (+). C'est par cette différence que sont distinguées les 2 extrémités lors d'expériences *in vitro*. En présence de 20 μM de tubuline, les vitesses de dépolymérisation (de l'ordre de 20 $\mu\text{m} / \text{min}$) sont quant à elles très rapides à chaque extrémité, environ 10 fois plus rapide que la polymérisation. La concentration en tubuline influence la vitesse d'élongation (plus la concentration est grande plus la vitesse est élevée) mais n'affecte pas la vitesse de dépolymérisation d'un MT.

Les transitions entre phases d'élongation et de raccourcissement sont marquées par des événements ponctuels. Une catastrophe désigne l'évènement de transition entre une phase de croissance et une phase de raccourcissement du MT. De la même manière, un événement de sauvetage marque la transition entre une phase de raccourcissement et une phase de croissance. La mesure des fréquences des évènements de catastrophe ou de sauvetage démontre que l'alternance des phases d'élongation et de raccourcissement est plus rapide à l'extrémité (+) qu'à l'extrémité (-) des MTs. Le dynamisme de l'extrémité (+) par sa vitesse et ses nombreuses transitions de phase est plus important qu'à l'extrémité (-). Cependant, lors d'une cinétique d'assemblage de tubuline, des pauses peuvent être observées aux 2 extrémités des MTs. Les pauses sont remarquables par l'absence de dynamisme à l'extrémité du MT.

Les mesures des paramètres cinétiques d'assemblage de la tubuline à l'échelle du MT individuel ont montré que l'instabilité dynamique des MTs peut être modélisée en utilisant des fréquences de catastrophe ou de sauvetage, des vitesses de polymérisation ou dépolymérisation et des fréquences de pauses constantes (Keller *et al.*, 2008). Ces paramètres dynamiques dépendent de la préparation de tubuline et du protocole expérimental employé. Le comportement d'instabilité dynamique est une caractéristique intrinsèque aux MTs.

Le comportement d'instabilité dynamique permet à lui seul d'expliquer des mécanismes biologiques complexes. Dès 1985, Mitchison et Kirschner suggèrent que l'instabilité dynamique des MTs soit à l'origine de la capture des chromosomes lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire en prophase pour former le fuseau mitotique bipolaire (Mitchison and Kirschner, 1985).

1.5.3 Le modèle de coiffe GTP

Proposé avant l'observation de l'instabilité dynamique des MTs, le modèle de coiffe GTP ou « *GTP-cap* » prédit l'état des nucléotides associés à la tubuline présente dans le MT. Melki et Carlier, (1993) ont décrit que pendant l'élongation, à l'extrémité d'un MT les dimères de tubuline-GTP s'incorporent avant l'hydrolyse du GTP en GDP de la tubuline β . Cette hydrolyse du GTP intervenant après un délai, l'extrémité des MTs est alors recouverte par une coiffe (ou couronne) de tubuline-GTP qui stabilise l'élongation du MT (Pantaloni and Carlier, 1986). Le comportement d'instabilité dynamique se décrit à l'aide de ce modèle. Ainsi, c'est la perte de la coiffe, par une hydrolyse de la tubuline GTP avant l'incorporation de nouvelles sous-unités, qui serait selon cette hypothèse à l'origine de la transition vers une phase de raccourcissement, voire de dépolymérisation totale. Les éléments en faveur de ce modèle sont la mesure d'un décalage entre assemblage de dimères et hydrolyse du GTP. De plus des expériences effectuées avec des analogues non-hydrolysables du GTP (comme le GMPCPP) montrent une très grande stabilité des MTs au cours du temps.

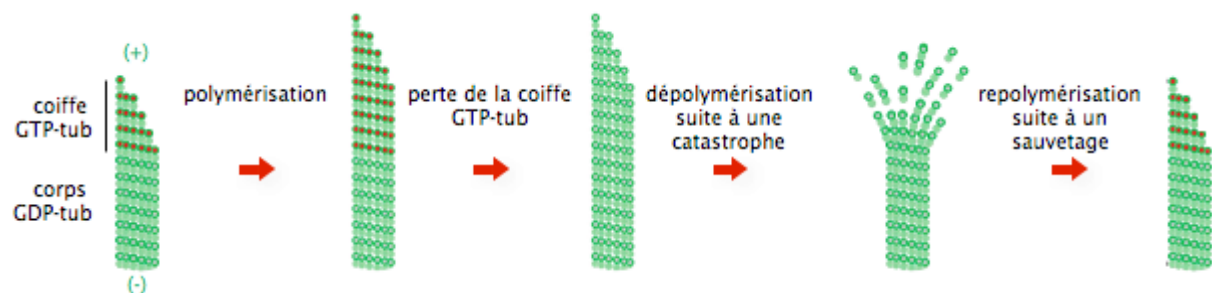


Figure 7: Modèle de la coiffe de tubuline GTP.

Lors de la polymérisation, des dimères de tubuline-GTP s'assemblent à l'extrémité du MT. L'hydrolyse du GTP associé avec la tubuline- β intervient après un court laps de temps qui favorisent l'accumulation de tubuline-GTP jusqu'à former une « coiffe » dite Cap-GTP. La perte de la coiffe peut entraîner un événement de catastrophe, et la dépolymérisation du MT. Un événement de sauvetage permet de restaurer la polymérisation du MT et de reformer une coiffe GTP. *Adapté de Cytoskeletal Structure and Function Becker et al. 6th ed.*

Tel qu'il est décrit, le modèle de coiffe GTP ne parvient pas à créer un consensus. En effet, le décalage entre l'assemblage et l'hydrolyse du GTP n'a pas été démontré de façon reproductible. Des expériences de désassemblage de MTs suggèrent que la coiffe est très courte et indépendante de la vitesse d'élongation (Voter *et al.*, 1991, Walker *et al.*, 1991). De plus, les modèles de coiffe ne parviennent pas à reproduire le comportement d'une population de MTs.

Récemment, (Valiron *et al.*, 2010) ont montré que des dimères de tubuline GDP sont capables de s'incorporer lors de la polymérisation des MTs. Ces données montrent que des dimères de tubulines GDP pourraient s'incorporer occasionnellement avec les dimères de tubuline GTP, et à des concentrations proches de la concentration critique d'assemblage de la tubuline, la tubuline GDP se comportant alors comme un compétiteur vis à vis de la tubuline GTP. L'incorporation de tubuline GDP modifie les paramètres d'instabilité dynamique des MTs : diminution des vitesses de polymérisation - dépolymérisation, baisse des fréquences de catastrophe. L'absence d'hydrolyse du GTP dans le MT pourrait ainsi expliquer la diminution du comportement d'instabilité dynamique des MTs. Par ailleurs, des expériences effectuées en présence d'analogues du GTP qui présentent une hydrolyse très lente (GMPCPP) montrent une stabilisation des MTs (Hyman *et al.*, 1992). L'ensemble de ces données suggère un fort lien entre l'hydrolyse du GTP et la stabilisation des MTs. L'incorporation du GTP pourrait représenter pour les cellules la possibilité de moduler l'hydrolyse du nucléotide associé aux parois des MTs lors de l'assemblage de la tubuline (Valiron *et al.*, 2010).

Au final, bien que les MTs soient composés quasi exclusivement de dimères de tubuline GDP, les MTs présentent un comportement dynamique différent selon le nucléotide initial associé à la tubuline lors de sa polymérisation (Valiron *et al.*, 2010). A terme, la dynamique des MTs n'est pas directement influencée par l'état du nucléotide associé à la tubuline mais par des paramètres structuraux comme le décrit le concept de plasticité dynamique (Kueh and Mitchison, 2009).

1.5.4 Influence des paramètres structuraux des MTs sur leur dynamique

Plusieurs études ont démontré que, non seulement les fluctuations des longueurs des MTs pouvaient être dépendantes de (i) l'état du nucléotide associé à la tubuline, mais aussi, (ii) d'évènements purement structuraux qui modifient l'extrémité des MTs. Les résultats obtenus en cryomicroscopie électronique, suggèrent une conformation plus courbée des dimères GDP alors que les dimères GTP seraient moins courbes. Lors de leur incorporation, les dimères sous forme GTP participeraient au maintien d'une configuration droite qui favorise la polymérisation. Au contraire, après hydrolyse du GTP en GDP, les dimères adoptent une configuration plus courbée. La stabilisation du stress engendré par les dimères GDP s'effectuerait par l'interaction avec les dimères adjacents présent dans le corps du MT (Kueh et Mitchison, 2009). Cependant cela rend le corps du MT fragile et sensible aux stress mécaniques qui peuvent intervenir à l'extrémité du MT. Les protofilaments peuvent s'écarter

et s'individualiser en adoptant une configuration arquée qui va libérer les contraintes mécaniques des dimères et propager une dépolymérisation le long du MT. Cette propagation du stress dissimulé dans les dimères de tubuline GDP, démontre par une approche structurale comment les extrémités peuvent perdurer dans des états de polymérisation ou de dépolymérisation. Ainsi, la dépolymérisation n'est pas directement induite par une hydrolyse du GTP des sous-unités mais par le relâchement d'une contrainte exercée entre plusieurs protofilaments à l'extrémité du MT (Kueh et Mitchison, 2009).

Des observations en cryomicroscopie ont montré que la MAP de bout (+) EB1 est capable d'accroître le dynamisme des MTs tout en favorisant une conformation fermée du feuillet de croissance du MT (Vitre *et al.*, 2008). Cela renforce l'idée de plasticité structurale des MTs développée par Kueh et Mitchison (2009), modèle dans lequel les propriétés cinétiques des MTs ainsi que les paramètres structuraux des dimères de tubulines jouent un rôle dans l'instabilité dynamique des MTs.

2. Distribution des réseaux de microtubules au cours du cycle cellulaire de plantes

Une caractéristique importante des cellules de plante est leur totipotence qui permet une reprogrammation de leur devenir. Ces cellules sont ainsi capables de se dé-différencier et de se re-différencier pour acquérir de nouvelles fonctions, et potentiellement de reconstituer un individu à partir de quelques cellules. Cet exemple montre la plasticité des cellules de plantes et leur capacité à s'adapter à leur environnement. Ceci est en partie possible grâce au dynamisme de son cytosquelette et particulièrement des MTs. Au cours du cycle cellulaire et du développement de la plante, les réseaux de MTs vont se succéder et se remplacer afin d'assurer des fonctions variées : trafic intracellulaire, mouvement d'organites, ségrégation des chromosomes ou encore participation à la cytokinèse. Les cellules quiescentes (« Gap 0 » ou délai 0) rentrant dans le cycle cellulaire subissent quatre étapes avant leur division : la phase G1 (« Gap 1 » ou délai 1), la phase S (« Synthesis » ou réplication de l'ADN), la phase G2 (« Gap 2 » ou délai 2) et la phase M (« Mitosis » ou mitose). Dès la fin de la mitose, les cellules peuvent quitter le cycle cellulaire et revenir dans une phase de non prolifération. La plupart des cellules dans un organisme adulte sont en phase G0, seul un nombre limité de cellules gardent la capacité d'une prolifération active. L'interphase représente 90% du temps passé par une cellule cyclante.

La régulation spatio-temporelle de l'organisation des MTs au sein des cellules ainsi que de leur comportement dynamique sont responsables de leur assemblage en réseaux complexes et réguliers, stables ou transitoires, mais toujours extrêmement reproductibles. Ces réseaux sont essentiellement constitués de MTs organisés en faisceaux dynamiques plus ou moins denses, dispersés dans le cortex cellulaire en interphase où ils jouent un rôle majeur dans la morphogenèse cellulaire (Figure 8). En mitose, la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse sont également liées à l'organisation en faisceaux des MTs (MTs interzonaux impliqués dans l'élongation du fuseau mitotique en mitose, fibres kinétochoriennes impliquées dans le mouvement des chromosomes, phragmoplaste impliqués dans la cytokinèse). Au sein de ces faisceaux, selon les types cellulaires considérés et les étapes du cycle cellulaire, les MTs sont alignés avec une même polarité ou au contraire sont alignés avec des polarités opposées.

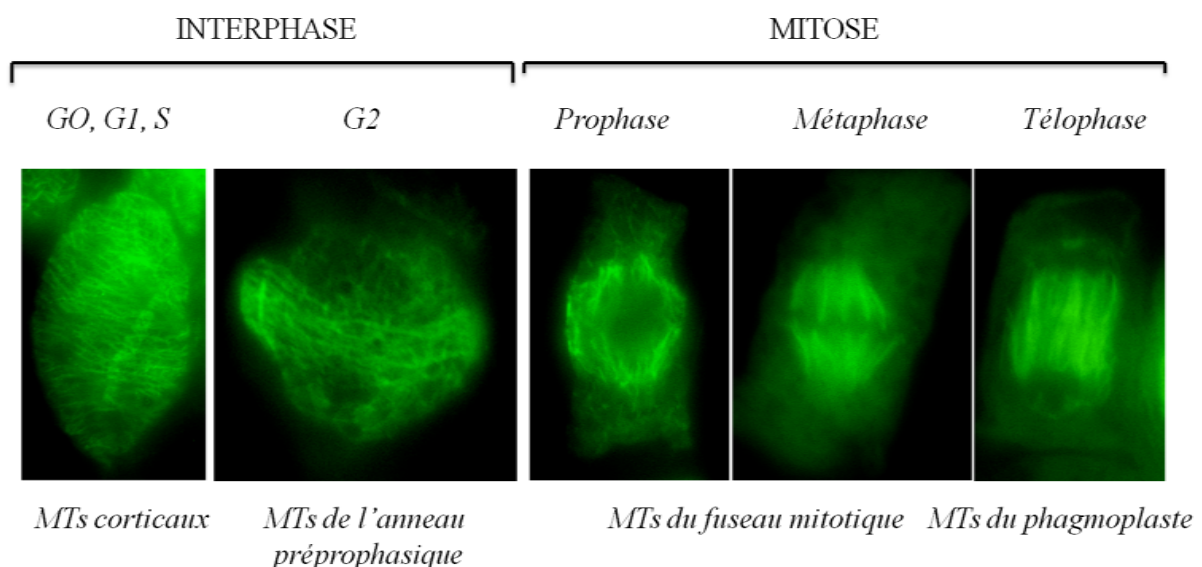


Figure 8: Distribution des MTs au cours du cycle cellulaire végétal.

Les réseaux microtubulaires se réorganisent au cours du cycle cellulaire afin d'assurer des fonctions essentielles.

2.1 'interphase

Dans les cellules de plante, en G1 comme en G0, les MTs sont organisés en faisceaux plus ou moins denses, parallèles et dispersés dans l'ensemble du cortex cellulaire : c'est le réseau cortical. Ces MTs ne sont pas reliés et organisés par un centre organisateur de MTs tel que le centrosome des cellules animales et leurs deux extrémités semblent libres. Ainsi, la

géométrie particulière du réseau cortical n'est pas le résultat d'une nucléation de MTs dans une configuration prédéfinie, mais résulte d'une organisation progressive des MTs après leur nucléation. Ces MTs sont notamment impliqués dans l'organisation du dépôt des microfibrilles de cellulose, et plus particulièrement dans la localisation et le guidage de la cellulose synthase, site de la synthèse de la cellulose (constituants majeurs de la paroi), (Paredez *et al.*, 2006). Ceci a pour but de former la paroi cellulaire et ainsi participer à l'expansion anisotrope de la cellule (Wasteneys, 2002). Une désorganisation du réseau cortical a pour conséquences un mauvais agencement des microfibrilles de cellulose et une croissance isotrope de la cellule (Baskin *et al.*, 2004). Dans les cellules en phase d'élongation, les MTs corticaux sont orientés perpendiculairement par rapport à l'axe majeur d'élongation des cellules.

La question qui se pose est comment des centaines, voire des milliers de MTs, après nucléation, vont s'auto-organiser pour former le réseau cortical impliqué dans des fonctions cellulaires majeures ?

Des données obtenues au cours des dernières années par des approches d'imagerie cellulaires et de génétiques ont permis d'identifier des étapes clés impliquées dans la genèse et l'organisation des réseaux corticaux de MTs dans les cellules de plantes (Figure 9) et qui sont :

- la nucléation des MTs à partir de sites de nucléation dispersés le long de MTs pré-existants et associés au cortex cellulaire. Ainsi, des études récentes ont identifié la présence de complexes γ -TuRC (γ -Tubulin Ring Complexes) sur le côté de MTs localisés sous la membrane plasmique. Ces complexes sont responsables de la nucléation des MTs corticaux (phénomène de « branching » , Murata *et al.*, 2005). Les MTs polymérisent selon un angle particulier de 40° dirigé vers l'extrémité (+) du MT mère (Chan *et al.*, 2009 ; Murata *et al.*, 2005), (Figure 9).

- le détachement des MTs de leur site de nucléation, vraisemblablement par fragmentation du MT par la katanine (Stoppin-Mellet *et al.*, 2006), générant de courts MTs mobiles qui vont se déplacer dans le cytoplasme (Shaw *et al.*, 2003).

- Le transport des MTs, après leur fragmentation, au sein du cortex cellulaire se réalise par le mécanisme de « treadmilling hybride » (Shaw *et al.*, 2003). Ce mécanisme permet l'addition de sous-unités de tubuline à l'extrémité (+) du MT et une perte de sous-unités à

l'autre extrémité. Dans ce cas, l'addition des dimères à l'extrémité (+) du MT est égale à la perte à l'autre extrémité. Ainsi, les microtubules sont redistribués dans le cytoplasme par un mécanisme basé sur l'assemblage et la dépolymérisation des microtubules ce qui donne l'apparence d'un transport, et ce jusqu'à ce qu'ils rencontrent des MTs plus stables et ou des faisceaux pré-existants. Si l'angle de rencontre est égal ou inférieur à 40°, le MT mobile va se co-aligner avec les MTs et/ou les faisceaux rencontrés pour générer de nouveaux faisceaux ou densifier des faisceaux existants. Si l'angle de rencontre est supérieur à 40°, le MT mobile est dépolymérisé ou fragmenté (Chan *et al.*, 2009 ; Dixit and Cyr, 2004 ; Shaw *et al.*, 2003). Ensemble, ces évènements prédisent la capacité d'auto-organisation des réseaux de MTs en structures ordonnées tel que le réseau cortical de MTs (Allard *et al.*, 2010).

Le coalignement des MTs implique de nombreuses protéines, en particulier des MAPs impliqués dans le « zippering » des MTs telles que AtMAP65-1 ou AtMAP65-5 (Gaillard *et al.*, 2008 ; Mao *et al.*, 2005a ; Smertenko *et al.*, 2004 ; Van Damme *et al.*, 2004b) et/ou des moteurs moléculaires (Wasteneys and Ambrose, 2009).

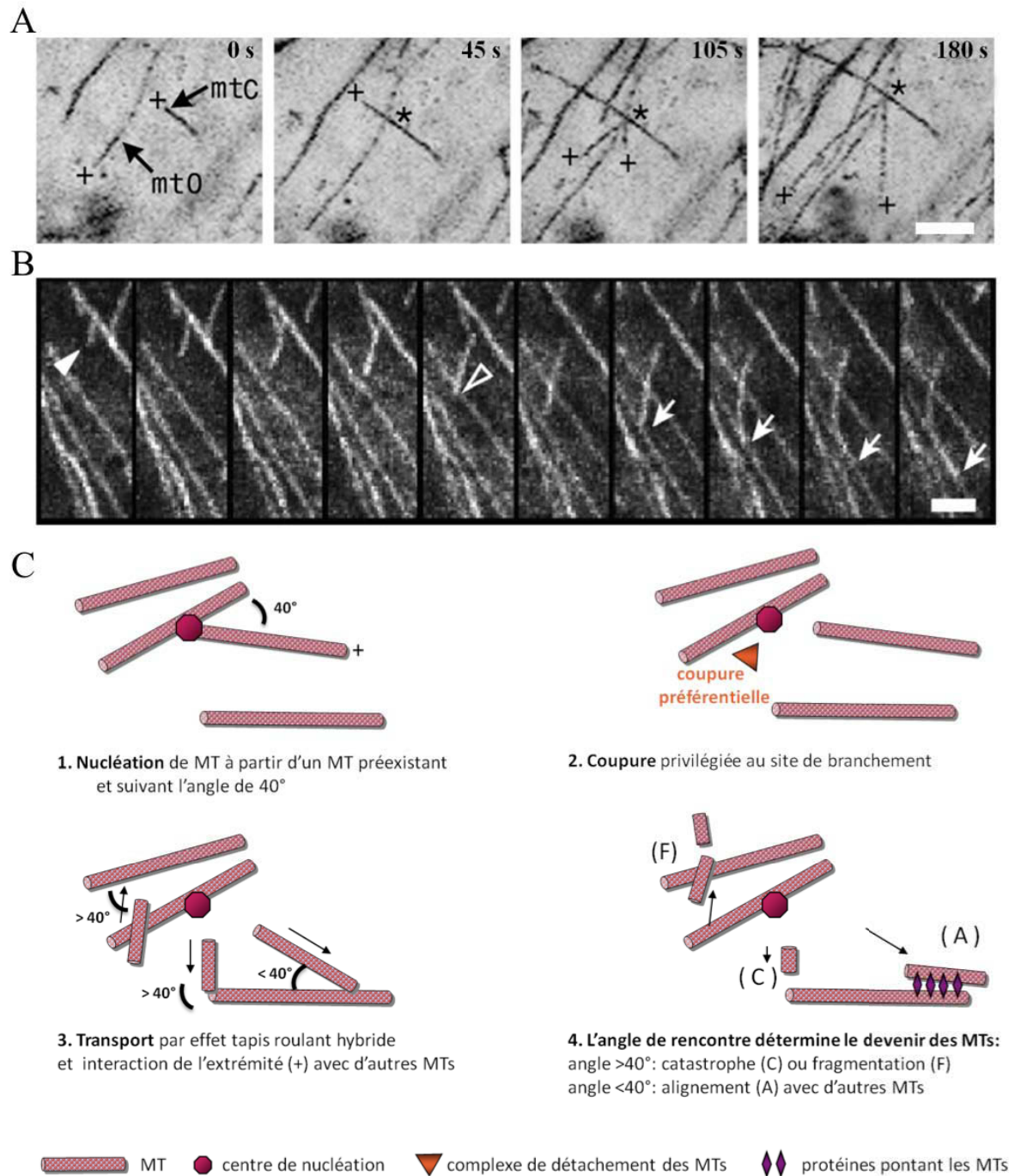


Figure 9 : Nucléation de MTs branchés sur des MTs préexistants.

- A. Polymérisation de 2 MTs à partir d'un même MT préexistant suivant un angle de branchement de 40° . Les MTs nucléés polymérisent vers l'extrémité (+) du MT mère. Barre d'échelle $7\ \mu\text{m}$. (Chan *et al.*, 2009).
- B. MT mobile croisant un MT avant d'en rencontrer un second avec un angle de 35° et de se coaligner. Durée totale de la séquence : 142 s, barre d'échelle $2,5\ \mu\text{m}$ (Shaw *et al.*, 2003).
- C. Schéma récapitulatif des étapes cruciales observées lors de l'auto-organisation des MTs corticaux.

2.2 La transition vers la mitose

Dans les cellules de plantes, le futur plan de division est défini en phase G2. Les MTs corticaux se désassemblent progressivement alors qu'un nouveau réseau s'assemble, constitué de faisceaux parallèles : l'anneau préprophasique (ou PPB, « preprophase band ») qui va définir l'emplacement du futur plan de division. Il disparaît progressivement lors de la prophase. La régulation de l'assemblage et la disparition de ce réseau de MTs restent très mal compris. Par des études de mutants d'*Arabidopsis* appelés *ton*, l'absence de PPB a montré que le fuseau mitotique restait fonctionnel mais que les plans de division étaient aléatoires (Traas *et al.*, 1995). Dans ce mutant, les gènes mutés codent pour une sous unité régulatrice du complexe phosphatase PP2A (Azimzadeh *et al.*, 2008 ; Camilleri *et al.*, 2002 ; Traas *et al.*, 1995). Leur rôle dans la mise en place du PPB reste non connu à ce jour mais cela montre l'importance de l'état de phosphorylation de protéines impliquées dans l'organisation du PPB. Par des approches similaires, l'implication de plusieurs MAPs a été identifiée dans la formation du PPB. Ainsi, l'absence de MOR1, orthologue de la XMAP215 chez les plantes, (Kawamura and Wasteney, 2008 ; Whittington *et al.*, 2001) conduit à l'absence dans 50% des cas de PPB et dans le reste des cas celui-ci présente des anomalies de structure (Kawamura *et al.*, 2006). En l'absence de CLASP, autre MAP conservée au cours de l'évolution, la mise en place du PPB est plus lente et les faisceaux de MTs qui le composent sont moins denses (Ambrose *et al.*, 2007 ; Kirik *et al.*, 2007). Finalement, plusieurs autres protéines dont des membres de la famille des MAP65s et qui ont la propriété *in vitro* d'induire des faisceaux de MTs, sont localisées avec les MTs du PPB suggérant un rôle dans son organisation en faisceaux (Muller *et al.*, 2009).

2.3 L'entrée en mitose

En fin de G2 et lors de la prophase, des MTs s'organisent à la périphérie du noyau pour former le futur fuseau mitotique. En l'absence de structure de nucléation définie tel que le centrosome, les sites de nucléation et les mécanismes qui régulent l'organisation de ces MTs restent jusqu'ici très mal connus. En G2, on observe un assemblage accru de MTs autour du noyau qui coïncide avec l'apparition de tubuline γ à sa surface (Liu *et al.*, 1993). De plus, Stoppin *et al.*, (1994) ont montré qu'*in vitro*, la surface du noyau se comporte comme un site de nucléation des MTs. Plus récemment, dans des cellules d'*Arabidopsis* en G2, un suivi de EB1-GFP (protéine associée à l'extrémité (+) des MTs) en microscopie à fluorescence a

permis de montrer une croissance centrifuge de MTs à partir de la surface du noyau (Chan *et al.*, 2005). Ces données suggèrent que la surface du noyau est impliquée dans la nucléation de MTs qui participeront potentiellement à l'organisation du futur fuseau mitotique. De plus, ces auteurs ont montré qu'en prophase les pôles du fuseau en formation sont le siège d'une importante nucléation de MTs (Chan *et al.*, 2005).

2.3.1 Implication des MTs dans la capture des chromosomes

La polarité des MTs du fuseau mitotique a été étudiée chez les plantes supérieures dans des cellules d'albumen d'*Haemanthus* par les travaux de Euteneuer *et al.* (1982). Leurs observations en microscopie électronique ont révélé que les MTs des fibres kinétochoriennes ont leurs extrémités (+) dans la zone équatoriale du fuseau mitotique alors que les extrémités se situent au niveau des pôles. Une même polarité des MTs avait été identifiée dans des cellules de mammifère (Euteneuer and McIntosh, 1981). En effet, dans celles-ci, les extrémités (-) sont localisées aux centrosomes situés aux pôles du fuseau mitotique.

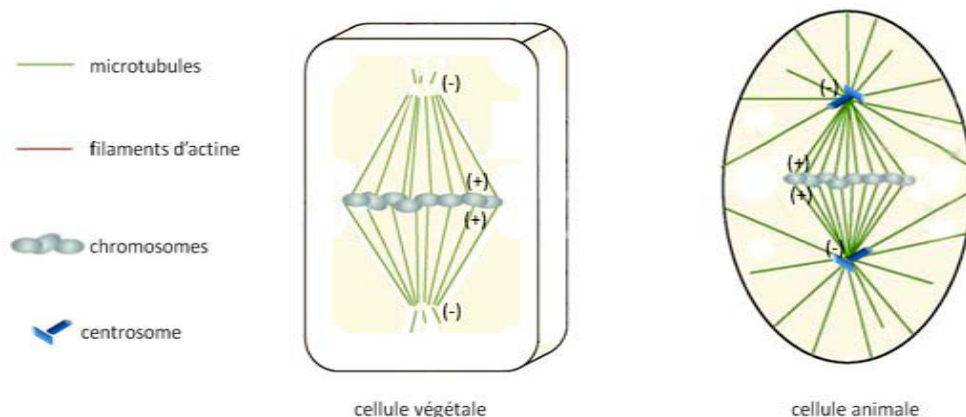


Figure 10: Comparaison des fuseaux mitotiques de cellule végétale et animale.

Le fuseau mitotique de la cellule végétale est bipolaire et les pôles sont dépourvus de centre de nucléation définis. Dans les cellules animales, les MTs du fuseau mitotique sont majoritairement organisés à partir des centrosomes. Ainsi les pôles du fuseau mitotique sont bien focalisés. Les MTs interpolaires n'ont pas été représentés. Adapté de Muller *et al.*, 2009

Dans les cellules acentrosomales, après rupture de l'enveloppe nucléaire, en prométaphase, les fibres kinétochoriennes se mettent en place et vont assurer le maintien de la bipolarité du fuseau mitotique. De la métaphase à l'anaphase, les fibres kinétochoriennes vont permettre de focaliser plus ou moins les pôles en présence de KCBP, une kinésine dirigée vers les

extrémités (-) des MTs *in vivo* (Smirnova *et al.*, 1998). Les fibres kinétochoriennes jouent un rôle crucial dans la division cellulaire, en effet se sont ces MTs qui vont exercer des forces sur les chromosomes (mouvement vers les pôles cellulaires) afin de leur permettre de répartir équitablement le matériel génétique entre les deux cellules filles issues de la division. Les données obtenues à partir de cellules animales montrent qu'après rupture de l'enveloppe nucléaire, des MTs polaires associés aux centrosomes vont envahir l'espace nucléaire pour capturer les kinétochores des chromosomes, le kinétochore correspondant au point de contact entre le MT et le chromosome.

Le mécanisme par lequel les kinétochores sont capturés dans les cellules possédant un centrosome repose sur l'hypothèse d'un mécanisme appelé « recherche et capture » (« search and capture ») qui est basé sur l'observation du comportement d'instabilité dynamique des MTs (Mitchison and Kirschner, 1985). Ainsi, après rupture de l'enveloppe nucléaire, les MTs nucléés aux pôles polymérisent de manière aléatoire et ne sont stabilisés que lorsqu'un kinétochore est capturé par leur extrémité (+), dans le cas contraire ils dépolymérisent puis re-polymérisent dans une autre direction jusqu'à ce que tous les kinétochores soient capturés. Cette étape requière l'attachement des deux kinétochores aux MTs appartenant aux 2 pôles du fuseau mitotique. La modélisation de ce mécanisme par Wollman *et al.*, (2005) a montré que le temps nécessaire à la capture de l'ensemble des kinétochores d'une cellule animale est trop long comparé aux données expérimentales. Ainsi dans une cellule HeLa, la prophase dure environ 20 min et selon le modèle 62 heures seraient nécessaires pour capturer les chromosomes par les MTs ! Le modèle montre que pour réaliser l'ensemble du processus, une relative stabilisation des MTs en direction des kinétochores est indispensable, et pourraient être liée à la présence d'un gradient de Ran-GTP (Wollman *et al.*, 2005). Ces auteurs ont redéfini le modèle de « recherche et capture » et l'ont nommé « biased search and capture ». L'existence de ce mécanisme n'a pas été clairement établie jusqu'ici chez les plantes dont le fuseau mitotique est acentrosomal.

Par ailleurs, il a été montré chez la drosophile que la nucléation de MTs au niveau des kinétochores pouvait participer à la formation des fibres kinétochoriennes. Après connexion par un MT polaire, une fibre pourrait être nucléée au kinétochore dans un environnement favorable grâce à l'activation de TPX2 (*Targeting Protein for Xklp2*) par un gradient de Ran GTP généré par les centromères (Gruss and Vernos, 2004 ; Maiato *et al.*, 2004). TPX2 possède un homologue chez *Arabidopsis* : *AtTPX2*. *AtTPX2* pourrait être impliquée dans l'organisation du pro-fuseau au niveau des pôles en prophase et participer à l'assemblage de MTs aux kinétochores (Vos *et al.*, 2008), (pour revue : Meier and Brkljadic, 2009).

Par ailleurs, il a été montré dans des cellules animales que lorsqu'un kinétochore est trop éloigné des pôles, une fibre pourrait être nucléée sans le contact préalable avec un MT polaire et serait ensuite redirigée vers les pôles au voisinage de MTs astraux grâce à des dynéines (Maiato *et al.*, 2004). Jusqu'ici la dynéine n'a pas été identifiée chez les plantes.

À la confluence de ces 2 mécanismes, une publication récente de (Kitamura *et al.*, 2010) démontre que, chez *Saccharomyces cerevisiae*, les kinétochores sont capables de générer des MTs d'une durée de vie très courte et dont le but est d'accélérer leur capture par les MTs émanant des « spindle pole body » (centre organisateur des MTs) localisés aux pôles. Ainsi, une MAP, Stu2, l'orthologue de XMAP215 est responsable de la nucléation et de l'allongement de ces courts MTs kinétochoriens. Ce mécanisme est notamment décrit lorsque les kinétochores sont très éloignés des pôles. Dans les cellules de mammifères, à partir du moment où un kinétochore est contacté par un MT, 10-30 MTs peuvent polymériser autour pour former une fibre kinétochorienne (Zhai *et al.*, 1995 ; McEwen *et al.*, 1998).

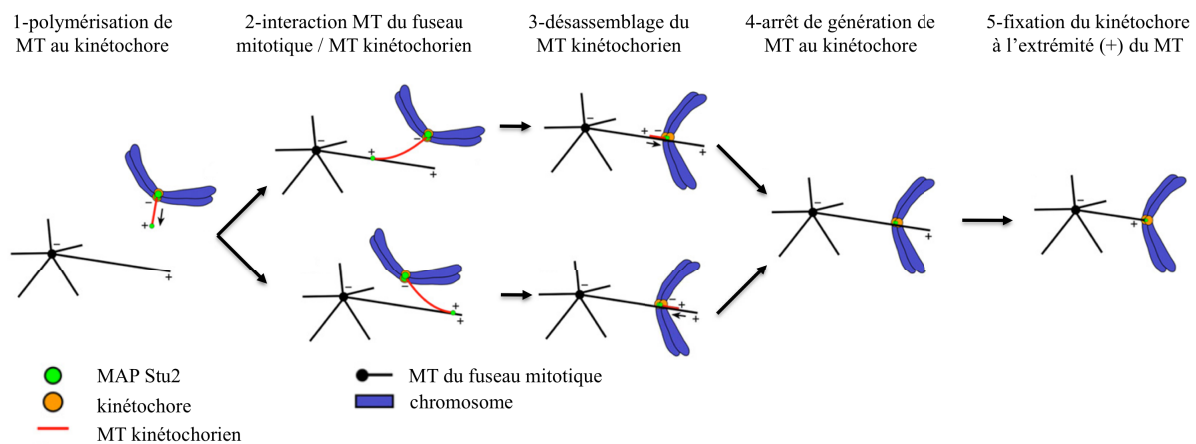


Figure 11: Mécanisme de capture des chromosomes par le fuseau mitotique proposé par Kitamura *et al.*, 2009. Des MTs sont générés par les kinétochores avec leurs extrémités (+) distales, favorisant ainsi le contact avec les MTs du fuseau mitotique. Après ce contact le MT kinétochorien est rapidement désassemblé puis le chromosome est fixé à l'extrémité du MT du fuseau mitotique.

La bipolarité du fuseau mitotique génère des tensions qui vont provoquer des glissements des kinétochores entre les pôles jusqu'à ce que les tensions engendrées par les 2 fibres s'équilibrent (Dhonshe *et al.*, 2006). En fin de métaphase, tous les chromosomes sont disposés à mi-chemin entre les pôles, et constituent la plan équatorial.

2.4 La transition métaphase / anaphase

Le signal qui marque le début de l'anaphase est la dégradation de la cohésine qui maintient les chromatides sœurs attachées et qui va entraîner le début de la montée des chromosomes aux pôles. L'anaphase est une phase rapide qui s'achève lorsque les chromosomes ont atteint les pôles du fuseau mitotique. La transition métaphase – anaphase est une étape hautement contrôlée. En effet, son déroulement conditionne la bonne répartition des chromosomes vers les futures cellules filles. Dans les cellules animales et la levure, cette transition a été beaucoup étudiée au cours de ces dernières années.

Suite à l'éclatement de la membrane nucléaire, un système de surveillance de la mitose fait intervenir de nombreux acteurs, notamment des protéines recrutées au niveau des kinétochores telles que des protéines de la famille des Bub et Mad. Un complexe de protéines passagères permet de contrôler que tous les kinétochores sont sous tension et permet un « dialogue » avec les autres protéines du complexe de surveillance (SAC, Spindle Assembly Checkpoint). Ce complexe empêche la transition vers l'anaphase en cas d'irrégularité d'attachement ou de positionnement des kinétochores sur le plan équatorial. Lorsque toutes les conditions sont réunies, une cascade de phosphorylation faisant intervenir la cycline Cdc20 aboutit au clivage des complexes de cohésines qui maintiennent les chromatides sœurs attachées et ainsi provoquer leur séparation (pour revues : Peters, 2006 ; Musacchio and Salmon, 2007).

Dans les cellules de plantes, l'existence d'un tel système de surveillance de la mitose a été suggéré par l'identification d'homologies de séquences entre membres du SAC de plantes avec d'autres organismes modèles, et aussi par des études transcriptomiques (Menges *et al.*, 2005). Récemment, les travaux de Caillaud *et al.*, (2009) tendent à montrer que les protéines d'*Arabidopsis* BUBR1, BUB3.1 et MAD2 doivent posséder des caractéristiques des protéines du point de contrôle mitotique qui sont conservées de la levure à l'humain.

2.5 L'anaphase

De l'échelle de la dizaine de minutes selon les types cellulaires considérés, l'anaphase constitue une phase très rapide pendant laquelle les chromatides sœurs migrent vers les pôles de la cellule suivant une vitesse constante de 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ pour toutes les cellules eucaryotes.

Dans les cellules animales, le mouvement des chromosomes est un processus en 2 phases : lors de l'anaphase A, le mouvement des chromatides sœurs vers les pôles requiert le

raccourcissement des fibres kinétochoriennes. Les fibres kinétochoriennes vont se dépolymérer par leur extrémité (+) liée au kinétochore. La kinésine MCAK (Mitotic Centromere Associated Kinesin) promeut la dépolymérisation des MTs kinétochoriens à leur extrémité (+) (pour revue : Howard and Hyman, 2007).

Ensuite, en anaphase B, un second mécanisme accentue le mouvement qui écarte les chromatides sœurs l'une de l'autre, il s'agit de l'élongation très sensible du fuseau mitotique (1,5 à 2 fois). L'éloignement des pôles s'explique en partie par les glissements des MTs interpolaire de polarités opposées, et également par la mobilité intrinsèque des centrosomes. La dynéine est considérée comme le moteur majeur impliqué dans le mouvement des chromosomes en anaphase, en raison de la vitesse et de la direction des trajectoires des chromosomes observés.

En ce qui concerne les cellules végétales, la dépolymérisation synchrone des fibres kinétochoriennes en anaphase A se réalise sous l'action de différents facteurs non identifiés. Par exemple, l'existence de kinésines ayant la capacité de dépolymériser des MTs en anaphase telle que MCAK n'a pas encore été démontrée. En anaphase B, l'extension du fuseau mitotique semble être le résultat de MTs polaires qui s'allongent par polymérisation active au niveau de leurs extrémités (+) distales. Simultanément, la kinésine ATK5, membre de la famille des kinésines 14 et localisée au niveau des MTs polaires interdigités en anaphase, pourrait être impliqué dans le glissement de ces MTs. La force centrifuge générée pourrait soutenir l'éloignement des deux demi fuseaux (Ambrose and Cyr, 2007). La contribution de l'éloignement des pôles fusoriaux en anaphase B dans le processus de séparation des chromosomes est d'environ 40 % dans les cellules de plantes, ce qui est comparable aux données recueillies pour les cellules animales (Hayashi *et al.*, 2007).

2.6 La sortie de mitose

La cytodierèse des cellules de plantes est très différente de celles des cellules animales car contrairement à celles-ci, la présence de la paroi cellulaire interdit une constriction pour séparer les cellules filles. La stratégie adoptée par les plantes est donc de créer une nouvelle paroi et de nouvelles membranes plasmiques entre les deux cellules filles issues de la division. Pour cela, le phragmoplaste s'assemble en fin d'anaphase, il s'agit d'un réseau de MTs propre aux cellules de plantes. Le phragmoplaste est, comme le fuseau mitotique, un complexe bipolaire composé de MTs antiparallèles qui interdigitent leurs extrémités (+) au niveau du plan de division (Wasteneys, 2002). Il sert de support de migration à des vésicules

golgiennes, qui vont fusionner, et constituer la plaque cellulaire (Wasteneys, 2002). Au cours du temps, le phragmoplaste s'agrandit latéralement et va assurer l'extension de la plaque cellulaire de façon centrifuge vers la périphérie de la cellule mère. Lorsque la nouvelle plaque cellulaire rejoint la paroi mère pour créer de nouvelles membranes plasmiques ainsi qu'une nouvelle paroi, la séparation des 2 cellules filles est achevée.

3. Les protéines associées aux microtubules (MAPs)

Comme décrit dans le paragraphe précédent, dans les cellules eucaryotes, le changement de conformation d'un type de réseau de MTs à un autre se réalise de manière précise et rapide et implique l'activité de nombreuses protéines qui interagissent directement avec les microtubules. Ces protéines peuvent être classées en plusieurs groupes selon leur activité : les effecteurs de l'assemblage ou du désassemblage des MTs, les effecteurs impliqués dans l'organisation structurale des MTs et les fonctions qui leur sont associées, et les moteurs moléculaires.

3.1 Les protéines nucléatrices de MTs

Dans les cellules eucaryotes, la tubuline γ joue un rôle prépondérant dans la nucléation des MTs. Elle est associée aux centres organisateurs de MTs : le centrosome dans les cellules animales, et son homologue, le SPB (« Spindle Pole Body ») chez la levure. La tubuline γ a également été observée sur le côté des MTs dans ces cellules. Dans les cellules de plantes, la tubuline γ est localisée le long de MTs en interphase, à la surface de l'enveloppe nucléaire en G2 et dans le fuseau mitotique (Liu *et al.*, 1993 ; Murata *et al.*, 2005). Des travaux basés sur une approche d'interférence à l'ARN sur les 2 gènes codant pour la γ -tubuline de plante (*TUBG1* et *TUBG2*, Liu *et al.*, 1994) ont démontré que des MTs préexistants et de la tubuline γ étaient nécessaires à la nucléation de MTs mais aussi à leur organisation en réseaux (Binarova *et al.*, 2006). La tubuline γ se présente dans les cellules animales sous la forme de deux complexes majeurs : le γ -TuSC (γ -Tubulin Small Complex ~300 kDa) et le γ -TuRC (γ -Tubulin Ring Complex ~2000 kDa) qui résultent de l'association de plusieurs γ -TuSCs avec des protéines associées. L'ensemble de ces protéines est regroupé sous le nom de GCPs pour « γ -tubulin Complex Proteins », la tubuline γ correspondant à GCP1. Les complexes GCPs ont une structure en anneau qui sert de matrice de nucléation pour amorcer la polymérisation d'un MT en bloquant son extrémité (pour revue : Job *et al.*, 2003). Le γ -TuSC est localisé préférentiellement aux centres organisateurs de MTs tels que le centrosome dans les cellules

animales et le « spindle pole body chez la levure (Raynaud-Messina and Merdes, 2007). Dans les cellules de plantes, la tubuline γ a été initialement observée comme étant associée à tous les réseaux de MTs de manière ponctuelle (Liu *et al.*, 1993). Les homologues des 5 GCPs associées à la tubuline γ ont été identifiées chez *Arabidopsis* sur la base d'homologies de séquences avec les GCPs de levure (Murata *et al.*, 2007). Les homologues de GCP2 et GCP3 sont localisées autour de l'enveloppe nucléaire lorsqu'elles sont surexprimées dans des cellules de tabac BY-2 en culture (Erhardt *et al.*, 2002) et semblent former un complexe soluble dans le cytoplasme des cellules avec la tubuline γ (Seltzer *et al.*, 2007). Plus récemment, les travaux de Kong *et al.* (2010) montrent qu'une réduction significative de la concentration de GCP4 dans des cellules d'*Arabidopsis* conduit à une localisation perturbée de la tubuline γ , et à l'assemblage d'un fuseau mitotique qui présente de nombreuses aberrations telles qu'une mauvaise focalisation des pôles et des défauts de bipolarité du phragmoplaste. De plus, les plantes présentent des retards de croissance significatifs. Ces résultats montrent que GCP4 est un élément indispensable de l'activité de nucléation de la tubuline γ , de l'organisation des MTs en mitose et lors de la croissance anisotropique des cellules d'*Arabidopsis*.

3.2 Les protéines impliquées dans l'assemblage/l'organisation des MTs

Jusqu'ici plusieurs MAPs de plantes ont été identifiées par des approches de génétique, de biochimie ou encore par homologies de séquences avec des MAPs animales connues. Cependant, malgré une progression importante de l'identification de ces protéines au cours des dernières années, notre connaissance de ces protéines, en comparaison avec les MAPs animales, reste très fragmentaire.

Les MAPs de plantes principalement étudiées jusqu'ici sont des protéines capables d'affecter le comportement dynamique des MTs et/ou d'induire des associations latérales entre les MTs. Ainsi, *MOR1* (pour MT Organization 1), un orthologue des membres de la famille des MAP215s, a été identifié par une étude de génétique comme une MAP essentielle à l'organisation des MTs corticaux d'*Arabidopsis* (Whittington *et al.*, 2001). Des études *in vivo* ont établi que MOR1 accélère la vitesse de polymérisation des MTs tout en augmentant les fréquences des événements de sauvetage et en supprimant les phases de pause (Kawamura and Wasteneys, 2008). Ces modifications du comportement d'instabilité dynamique des MTs ont pour conséquence de promouvoir une croissance des MTs. L'activité de la MAP pourrait être régulé par sa phosphorylation comme le suggèrent des recherches menées sur XMAP215, orthologue de MOR1 chez le xénope (Charrasse *et al.*, 2000 ; Vasquez *et al.*, 1999). Un autre

homologue des MAP215s a été identifié chez le tabac sous le nom de MAP200 (Yasuhara *et al.*, 2002). La caractérisation *in vitro* de la dynamique des MTs en présence de MAP200 montre que celle-ci favorise la polymérisation des MTs tout en augmentant les fréquences des événements de catastrophe et de sauvetage des MTs (Hamada *et al.*, 2009). De plus, lorsque le rapport tubuline GDP/GTP augmente dans le milieu, la fréquence des événements de catastrophe normalement induits par MAP200 diminue fortement. L'ensemble des données obtenues par ces auteurs suggèrent que MAP200 pourrait induire les événements de catastrophe par un mécanisme spécifique dépendant du GTP et permettent de proposer un modèle dans lequel les catastrophes sont provoquées par un mécanisme distinct du Cap-GTP. Des membres d'une autre famille de protéines conservées au cours de l'évolution, les MAP65s, ont également été identifiés chez les plantes. Une description plus complète des membres de cette famille est donnée paragraphe 4, page 38. En effet, l'étude d'un de ces membres chez *Arabidopsis*, *AtMAP65-4* fait l'objet de mon travail de thèse.

Par des approches de protéomique, une famille de MAPs spécifique aux cellules de plantes, les MAP70s, a été identifiée dans les bases de données d'*Arabidopsis* (Korolev *et al.*, 2005). Cette famille comporte 5 membres dont les poids moléculaires apparents sont de 70 kDa. *AtMAP70-1*, -2, -3 et -4 présentent entre elles 70 à 80% d'homologies alors qu'*AtMAP70-5* présente une séquence plus divergente (47% d'homologie avec les autres membres). Cette protéine ne diminue pas la concentration critique à l'assemblage de la tubuline *in vitro* mais augmente l'élongation des MTs (Korolev *et al.*, 2007). Récemment, Pesquet *et al.*, (2010) ont montré que dans les cellules qui constituent le xylème, l'expression d'*AtMAP70-5* est co-régulée 1) avec la cellulose synthase, enzyme impliquée spécifiquement dans la formation des parois secondaires des cellules et 2) avec des nucléases impliquées dans la mort cellulaire. Le xylème est un tissu formé de l'association de vaisseaux qui vont permettre le transport de grandes quantités d'eau et de nutriments depuis le sol jusqu'aux feuilles. De plus, ces auteurs ont montré une interaction entre *AtP70-1* et *AtP70-5*, leur co-localisation avec des MTs corticaux et leur rôle essentiel dans la régulation de l'épaisseur des parois secondaires des tissus du xylème, étape clés de la formation du bois.

Les protéines de bout (+) ou « +Tips » désignent les MAPs qui s'accumulent aux extrémités (+) des MTs. Les (+) Tips sont capables de modifier les propriétés dynamiques des MTs comme cela a été démontré chez les mammifères ou la levure (Bieling *et al.*, 2007 ; Katsuki *et al.*, 2009). On distingue notamment EB1 (*End Binding protein 1*), CLIP-170 (*Cytoplasmic Linker Proteins*), CLASPs (*CLIP-associated Protein*), LIS1 (*LISSENCEPHALY1*), dynactin (p150 Glued), APC, spectroplakins... Elles peuvent être présentes sous forme de complexes

qui sont impliqués dans le transport intracellulaire et l'attachement des MTs à d'autres structures comme la membrane cellulaire, à l'appareil de Golgi ou encore avec le cytosquelette d'actine chez les animaux et les levures. Jusqu'ici plusieurs homologues potentiels de +Tips ont été identifiés dans le génome d'*Arabidopsis* comme EB1s (Bisgrove *et al.*, 2004), CLASPs (Kirik *et al.*, 2007), et LIS1 (Bisgrove *et al.*, 2004) alors que CLIP-170, la dynéine cytoplasmique et la dynactine ne semblent pas présentes.

Trois homologues d'EB1 ont été identifiés dans le génome d'*Arabidopsis*: *AtEB1a* et *AtEB1b* sont localisées à l'extrémité (+) des MTs lorsqu'elles sont exprimées dans différents types cellulaires alors qu'*AtEB1c* est présente dans le noyau en interphase et associée au fuseau mitotique. Si la fonction d'*AtEB1c* reste non comprise, les fonctions d'*AtEB1a* et -b semblent comparables à celles décrites pour les cellules animales bien que leurs propriétés moléculaires soient peu étudiées à ce jour (revue, Hamada *et al.*, 2007).

Dans les cellules animales, CLASP se lie à la fois avec les protéines de la famille des CLIPs et aux MTs. Dans les fibroblastes, CLASP est localisée avec CLIP-170 à l'extrémité des MTs et joue un rôle stabilisant (Akhmanova *et al.*, 2001). Ceci est confirmé chez la levure où l'étude *in vitro* de (Al-Bassam *et al.*, 2010) démontre que CLASP est capable de lier des dimères de tubulines dont le relargage permettrait de stopper rapidement les événements de catastrophe et favoriserait la polymérisation du MT. CLASP, est présent chez *Arabidopsis* (un seul gène est présent) et est localisée à l'extrémité (+) des MTs corticaux mais également le long de MTs corticaux *via* un deuxième domaine de liaison aux MTs. Cette localisation permettrait un ancrage des MTs au cortex cellulaire. Ces différentes localisations dépendent des compartiments cellulaires et des types cellulaires considérés (Kirik *et al.*, 2007). La perte de fonction d'*AtCLASP* entraîne une perte partielle de l'attachement de MTs au cortex cellulaire et augmente ainsi les événements de rencontres entre MTs induisant une augmentation du nombre de faisceaux de MTs (Ambrose and Wasteneys, 2008). Ces données indiquent qu'*AtCLASP* pourrait être impliquée dans la régulation de l'auto organisation des réseaux de MTs corticaux et par voie de conséquence dans la morphogenèse cellulaire et tissulaire (Ambrose and Wasteneys, 2008).

Des protéines de bout (+) spécifiques aux plantes ont également été identifiées par des approches de génétique chez *Arabidopsis* telles que SPIRAL1 (SPR1) et SPIRAL2 (SPR2). SPR1 est impliquée dans l'orientation des tissus en croissance. En effet, les mutants *spr1* possèdent des organes torsadés (Sedbrook *et al.*, 2004). A l'échelle cellulaire, SPR1 se localise avec l'ensemble des réseaux de MTs et possède une préférence pour les extrémités (+) des MTs du réseau cortical. Cette protéine serait impliquée dans la modification de la

dynamique de polymérisation des MTs mais aussi dans leur distribution ce qui à terme influence l'orientation des microfibrilles de cellulose (Sedbrook *et al.*, 2004). SPR2 est essentiellement localisée avec des MTs du réseau cortical sous forme de particules le long des MTs et à l'extrémité (+) des MTs. Dans les mutants *spr2*, une augmentation significative des pauses à l'extrémité (+) des MTs est observée. *In vitro*, SPR2 favorise l'assemblage des MTs et inhibe les pauses suggérant qu'*in vivo* SPR2 régule l'état de pause pour faciliter les transitions entre les phases de croissance et de dépolymérisation des MTs (Yao *et al.*, 2008). Selon plusieurs équipes et des études menées sur d'autres organismes, d'autres MAPs potentielles de plantes auraient une fonction associée soit à la membrane plasmique (Cai *et al.*, 2005), au réseau d'actine (Igarashi *et al.*, 2000) ou encore à l'ARN (Chuong *et al.*, 2004).

3.3 Les protéines responsables de la déstabilisation des MTs

La régulation de la longueur des MTs dans la cellule s'exerce au moment de leur assemblage mais aussi de leur désassemblage. Si plusieurs MAPs de plantes sont identifiées pour favoriser l'assemblage des MTs, seulement deux protéines déstabilisatrices ont été identifiées : la katanine (Stoppin-Mellet *et al.*, 2002) et MAP18 (Wong *et al.*, 2007).

La plus étudiée jusqu'ici reste la katanine qui est une protéine qui fragmente les MTs (Hartman and Vale, 1999). Son rôle a été démontré ou proposé dans différents processus cellulaires dont la mitose/méiose, la différenciation neurale et la physiologie du flagelle. Elle est essentiellement localisée au centrosome des cellules en interphase et en mitose (Ahmad *et al.*, 1999). La katanine est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique (P60) qui hydrolyse l'ATP pour fragmenter les MTs (Hartman and Vale, 1999) et d'une sous-unité régulatrice (P80) responsable de l'adressage de P60 au centrosome (McNally *et al.*, 2000). P60, en présence de son substrat, le MT, forme un homo-oligomère transitoire capable d'hydrolyser l'ATP, l'énergie libérée étant utilisée pour la fragmentation. L'oligomère de P60 formerait un anneau qui aurait la capacité de déstabiliser les microtubules (Hartman and Vale, 1999). La résolution récente de la structure de la spastine, homologue de la katanine et originellement identifiée dans les cellules neurales, a permis de présenter un mécanisme moléculaire de fragmentation des MTs par ces deux protéines (Roll-Mecak and McNally, 2010).

Chez les plantes, la sous unité catalytique d'*Arabidopsis* (AtKSS : Arabidopsis Katanin Small Subunit) a été identifiée et son activité de fragmentation des MTs *in vitro* a été démontrée (Stoppin-Mellet *et al.*, 2002 ; Stoppin-Mellet *et al.*, 2006). Des analyses de

mutants d'*AtKSS* ont démontré qu'en son absence ou dans le cas d'une altération de son activité, les réseaux corticaux de MTs sont désorganisés, suggérant un rôle crucial d'*AtKSS* dans leur organisation (Bouquin *et al.*, 2003 ; Burk *et al.*, 2001). L'étude de la sur-expression d'*AtKSS* sous la dépendance d'un promoteur inductible dans divers types cellulaires montre que dans une première étape, il y a formation de faisceaux de MTs épais et sans orientation définie dans le cortex cellulaire de divers types cellulaires, puis les faisceaux vont être puis graduellement raccourcis pour finalement disparaître totalement (Stoppin-Mellet *et al.*, 2006). Ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle, en interphase, l'activité majeure d'*AtKSS* est de fragmenter les MTs dans le but de les détacher de leur site de nucléation pour générer des MTs mobiles dans le cytoplasme. L'analyse de la localisation d'*AtKSS* en microscopie FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) montre une localisation à l'extrémité de MTs (pour dépolymériser?) et à des points de courbures de MTs dans certaines zones du cortex cellulaire (Barton *et al.*, 2009). La localisation de la katanine à ce niveau de résolution *in situ* est le seul exemple connu à ce jour.

Dans les cellules animales ou de levure, plusieurs protéines apparentées à la katanine ont été identifiées comme la spastine, la fidgetine ou VPS4 (Roll-Mecak and McNally, 2010). L'autre protéine spécifique aux plantes et ayant la propriété de dépolymériser les MTs, est MAP18, qui a été identifiée pour dépolymériser les MTs *in vitro* et déstabiliser les réseaux de MTs *in vivo* lorsqu'elle est surexprimée dans des plantes d'*Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2007). Jusqu'ici les propriétés moléculaires de cette protéine restent non décrites. Des kinésines ayant la propriété de dépolymériser des MTs telle que MCAK chez les animaux n'ont pas encore été identifiées chez les plantes.

3.4 Les protéines impliquées dans la formation de faisceaux de MTs

L'étape de formation de faisceaux de MTs est cruciale pour créer et organiser les réseaux de MTs observés dans le cortex cellulaire en interphase et le fuseau de division en mitose. Cependant, notre connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions MTs - MTs lors de l'assemblage et l'organisation des faisceaux reste jusqu'ici faible. Dès 1978, des protéines qui maintiennent les MTs associés dans les réseaux corticaux de cellule de plantes ont été observées en microscopie électronique (Hardham and Gunning, 1978). Par la suite, des protéines associées aux MTs et capables d'induire collectivement la formation de faisceaux de MTs *in vitro* furent purifiées biochimiquement (Chang-Jie and Sonobe, 1993 ; Kakimoto and Shibaoka, 1988 ; Sonobe *et al.*, 2001 ; Vantard *et al.*, 1990). Un groupe de

protéines ayant un poids moléculaire apparent voisin de 65 kDa et appelées MAP65s ont été initialement isolées biochimiquement à partir d'extraits cytoplasmiques de cellules de tabac BY-2 (Chang-Jie and Sonobe, 1993). *In vitro*, ces protéines induisent collectivement la formation de faisceaux de microtubules. Le premier ADNc codant pour l'une de ces protéines, *NtMAP65-1*, a été cloné en 2000 (Smertenko *et al.*, 2000) et la connaissance de cet ADNc a permis d'identifier dans les banques de données d'*Arabidopsis* 9 séquences apparentées: *AtMAP65-1-9* (Hussey *et al.*, 2002). Ces protéines font partie d'une famille conservée au cours de l'évolution, la famille des MAP65s, dont des homologues ont été trouvés chez différentes espèces modèles telles que Ase1 chez la levure (Schuyler *et al.*, 2003), FEO chez la drosophile (Verni *et al.*, 2004) et PRC1 chez les mammifères (Mollinari *et al.*, 2002). Cependant, les identités de séquences sont faibles suggérant que les MAP65s ont adopté des propriétés différentes.

Jusqu'ici, seules *AtMAP65-1*, *AtMAP65-5* et *AtMAP65-2* ont été identifiées pour induire la formation de faisceaux de MTs *in vitro* (Chan *et al.*, 1999, Smertenko *et al.*, 2004, Gaillard *et al.*, 2008 et Li *et al.*, 2009). La description des connaissances actuelles de ces MAPs est détaillée paragraphe 4 de l'introduction.

Récemment, une approche de génétique a abouti à l'identification de WVD2 (Perrin *et al.*, 2007). *In vitro*, WVD2 organise les MTs en faisceaux et, *in vivo*, elle est associée aux MTs corticaux. L'analyse de mutants *WVD2* d'*Arabidopsis* tend à montrer que la stabilisation des MTs par cette MAP doit promouvoir une croissance hélicoïdale des MTs du cortex des cellules racinaires, tournant dans le sens des aiguilles d'une montre.

3.5 Le cas particulier des kinésines : transporteurs et organisateurs de MTs

Les kinésines sont des moteurs moléculaires associés aux MTs qui assurent des fonctions diverses au sein de la cellule incluant les transports de vésicules, d'organelles, de complexes protéiques et de ribonucléoprotéines (RNPs), etc. Les kinésines sont également décrites pour leur activité de régulation de l'assemblage des MTs. Cette multiplicité de fonctions explique que des dizaines de kinésines aient été répertoriées chez les organismes modèles, et classées en 14 grandes familles selon leur séquence et le positionnement de leur domaine moteur. Cette classification a été proposée par Lawrence *et al.*, (2004). Les kinésines sont des enzymes qui pour effectuer leurs fonctions (transport, dépolymérisation de MTs, etc) hydrolysent l'ATP pour convertir l'énergie chimique libérée en énergie mécanique. Chronologiquement, la première kinésine identifiée fut la kinésine conventionnelle de type 1

qui se localise dans les cellules neurales et réalise le transport de vésicules le long des axones.

Chez *Arabidopsis*, 61 kinésines ont été identifiées essentiellement sur la base d'homologies de séquence avec les kinésines animales et de levures déjà identifiées (Lee and Liu, 2004) et réparties dans les 14 sous-familles définies pour les kinésines animales. Jusqu'ici, seules quelques unes de ces kinésines potentielles de plantes ont été étudiées. ATK5 a été identifiée chez *Arabidopsis* comme faisant partie de la famille des kinésines 14. Elle s'accumule préférentiellement à l'extrémité (+) des MTs. ATK5 est localisée uniquement en mitose avec les MTs interdigités de l'anaphase et avec les MTs du phragmoplaste en télophase. Les données obtenues *in vitro* montrent qu'ATK5 est capable de coaligner des MTs sans orientation définie (Ambrose and Cyr, 2007). L'ensemble des données obtenues jusqu'ici, essentiellement par le groupe de R. Cyr (Penn University, USA), et par analyses de mutants d'*ATK5* suggèrent que cette kinésine pourrait générer de la force pour coaligner des MTs et participer au maintien de la bipolarité du fuseau mitotique, contrôler sa longueur et sa largeur (Ambrose and Cyr, 2007). KCBP (kinesin-like calmodulin-binding protein), une autre kinésine qui pourrait être impliquée dans le maintien de la bipolarité du fuseau mitotique a été décrite (Smirnova *et al.*, 1998). Cette kinésine a la particularité de lier la calmoduline sous la dépendance du calcium régulant ainsi sa liaison aux MTs *in vitro* (Vinogradova *et al.*, 2004). Cependant jusqu'ici aucune donnée moléculaire quant au rôle de KCBP au cours de la mitose n'a été publiée.

Contrairement au monde animal, aucune kinésine ayant la propriété de dépolymériser des MTs ou de transporter des cargos n'a été caractérisée jusqu'ici chez les plantes supérieures.

4. L'étude des *AtMAP65s*

4.1 Caractérisation des MAP65s chez *Arabidopsis*

Après l'identification de 9 séquences correspondant aux membres de la famille des MAP65s chez *Arabidopsis* en 2002 (Hussey *et al.*, 2002), (Figure 12), plusieurs équipes de recherche ont étudiés les propriétés moléculaires et fonctionnelles de certains de ces membres. Jusqu'ici *AtMAP65-1* reste la plus étudiée et elle correspond à l'homologue de PRC1 chez les mammifères (Mollinari *et al.*, 2002) et de Ase1 chez la levure (Schuyler *et al.*, 2003). *AtMAP65-1* et son homologue de *Nicotiana tabaccum* *NtMAP65-1* induisent la formation de faisceaux de MTs *in vitro* (Smertenko *et al.*, 2004 ; Wicker-Planquart *et al.*, 2004).

4.1.1 Caractérisation d'*At*MAP65-1

La localisation cellulaire d'*At*MAP65-1 a été étudiée par plusieurs équipes par des approches d'immunocytochimie et d'expression stables fusionnée avec une protéine fluorescente (GFP), (Chan *et al.*, 1999 ; Smertenko *et al.*, 2000 ; Gaillard *et al.*, 2008 ; Van Damme *et al.*, 2004a ; Van Damme *et al.*, 2004b). Ces analyses ont été majoritairement réalisées dans des cellules de tabac BY-2, cellules qui constituent un bon modèle cellulaire chez les plantes. Les résultats démontrent qu'*At*MAP65-1 est associée aux MTs du réseau cortical en interphase, avec le PPB en G2, les MTs interdigités en anaphase et avec les MTs du phragmoplaste en fin de mitose. Récemment, en collaboration avec Dimitrios Skoufias (IBS, Grenoble), l'équipe a montré que la surexpression d'*At*MAP65-1 et d'*At*MAP65-5 dans des cellules de mammifère induit la formation de faisceaux de MTs autour du noyau et leur localisation avec les MTs du corps intermédiaire ou « midbody » en cytokinèse. Ces propriétés sont comparables à celles décrites lors de surexpression de PRC1 (Zhu *et al.*, 2006), et indiquent que des homologies de fonction peuvent exister entre *At*MAP65-1 et PRC1.

In vitro, *At*MAP65-1 induit la formation de faisceaux de MTs. Au sein des faisceaux, les MTs sont organisés parallèlement les uns aux autres, espacés d'environ 30 nm (Chan *et al.*, 1999 ; Gaillard *et al.*, 2008 ; Smertenko *et al.*, 2004). Des analyses en cryomicroscopie ont permis de déterminer qu'*At*MAP65-1 est diagonalement orientée par rapport à l'axe des MTs avec un angle de 60° et que l'orientation est inversée de part et d'autre des MTs (décoration en arêtes de poisson), (Gaillard *et al.*, 2008). De plus, cette étude a montré que la polarité des microtubules dans les faisceaux induits par *At*MAP65-1 était inversée apportant ainsi les premières évidences moléculaires selon lesquelles ces protéines pourraient réguler la polarité des microtubules *in vivo*. L'étude de la diffraction des objets observés en cryomicroscopie révèle une distribution régulière des *At*MAP65-1 le long des MTs avec une périodicité de 80 angström, soit une MAP par hétérodimères de tubulines pour un rapport stœchiométrique, dimères de tubulines / *At*MAP65-1 de 1 :1. Ces études ont été réalisées en parallèle avec *At*MAP65-5 et montrent des propriétés comparables (Gaillard *et al.*, 2008). Une distribution comparable aux sein de faisceaux de MTs vient d'être publiée pour PRC1 (Subramanian *et al.*, 2010). De plus, *At*MAP65-1 et -5 sont monomériques en solution et ne s'accumulent pas le long de MTs individuels (Gaillard *et al.*, 2008 ; Stoppin-Mellet *et al.*, article soumis, Cf Chapitre III). L'analyse des domaines

fonctionnels d'*AtMAP65-5* et *AtMAP65-1* montre que ces deux MAPs ne possèdent qu'un seul domaine de liaison aux MTs, localisé dans la partie conservée au cours de l'évolution (domaine C-terminal), les domaines N-terminaux et centraux étant impliqués dans la formation des faisceaux de MTs. Ainsi, l'activité de ces deux MAPs pourrait impliquer la liaison instable de sous-unités monomériques le long des microtubules, suivie par une homo-dimérisation de leurs domaines N-terminaux lorsque deux microtubules adjacents se rencontrent, « zippant » les MTs et stabilisant leur liaison aux MTs. S'il n'y a pas homo-dimérisation des MAPs, leur liaison aux microtubules n'est pas stable (Gaillard *et al.*, 2008 ; Stoppin-Mellet *et al.*, article soumis, Cf Chapitre III).

Des données issues de puces à ADN réalisées sur des extraits cellulaires (Smertenko *et al.*, 2004 ; Van Damme *et al.*, 2004b) démontrent qu'*in vivo*, l'expression d'*AtMAP65-1* est constante, ce qui suggère un contrôle post-transcriptionnel de la régulation de l'activité d'*AtMAP65-1*. Au niveau de la localisation d'*AtMAP65-1*, des plantes transformées exprimant un gène rapporteur GUS sous contrôle d'un promoteur fort illustrent une localisation dans la majorité des tissus cellulaires d'*Arabidopsis* (Smertenko *et al.*, 2004).

Afin d'étudier le contrôle de la distribution spatio-temporelle d'*AtMAP65-1*, la régulation de sa liaison aux MTs et /ou de son activité par phosphorylation a été étudiée. Ainsi, Smertenko *et al.*, (2006) ont montré qu'elle était hyperphosphorylée de la prométaphase à la métaphase, phases du cycle cellulaire où elle n'est pas localisée avec des MTs. *In vitro*, la phosphorylation constitutive de sites phosphorylés potentiellement par des kinases CDK (kinases potentielles identifiées par l'analyse de la séquence d'*AtMAP65-1*) induit une réduction de 40% de sa liaison aux MTs. En parallèle, Sasabe *et al.*, (2006) ont montré qu'une MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) de tabac (NRK1) impliquée dans l'expansion du phragmoplaste, phosphoryle une thréonine d'*AtMAP65-1* localisée dans son domaine C-terminal. Cette phosphorylation entraîne une diminution, mais pas l'abolition de la liaison de la MAP aux MTs *in vitro*. L'expression d'*AtMAP65-1* non phosphorylable par CDK et par NRK1 dans des cellules de tabac en mitose, est réalisée dans ces deux études, induit des retards en métaphase (Smertenko *et al.*, 2006 ; Sasabe *et al.*, 2006) et des défauts dans l'expansion du phragmoplaste dans le cas de la phosphorylation par NRK1 (Sasabe *et al.*, 2006). Les auteurs concluent que l'inactivation par phosphorylation d'*AtMAP65-1* au cours de la métaphase et lors des transitions métaphase-anaphase est importante pour un déroulement correct de l'anaphase et l'expansion du phragmoplaste. Jusqu'ici, seule la phosphorylation par NRK1 semble spécifique. Les autres kinases responsables de la

phosphorylation d'*AtMAP65-1* restent à être identifiées et la compréhension de la régulation de l'activité de cette protéine est encore loin d'être comprise.

4.1.1 Caractérisation de différentes *AtMAP65s*

Les données réunies pour les autres *AtMAP65s*, à l'exception d'*AtMAP65-5* qui présentent des propriétés moléculaires comparables à *AtMAP65-1* (cf paragraphe ci-dessus), sont beaucoup plus fragmentaires et seule la localisation de certaines d'entre elles est décrite. Ces données sont résumées dans le tableau récapitulatif donné (Figure 12). Ainsi, *AtMAP65-2* induit la formation de faisceaux de MTs *in vitro* et est localisée avec tous les réseaux de MTs *in vivo* (Li *et al.*, 2009). *AtMAP65-3* est localisée avec le fuseau mitotique et le plan de division en mitose (Caillaud *et al.*, 2008), *AtMAP65-4* est localisée avec le fuseau mitotique (Van Damme *et al.*, 2004a ; Smertenko *et al.*, 2008) et *AtMAP65-5* se lie aux microtubules corticaux en interphase, avec le PPB et les MTs localisés autour du noyau en G2, avec les MTs interdigités en fin de métaphase et en anaphase (Van Damme *et al.*, 2004a ; Van Damme *et al.*, 2004b). *AtMAP65-6* a été décrite comme localisée avec les mitochondries par Mao *et al.*, (2005b) et avec le fuseau mitotique en anaphase par Smertenko *et al.*, (2008). Enfin, un seul mutant a été décrit à ce jour, un mutant d'*AtMAP65-3* (pléiade) qui présente des défauts de cytokinèse (Caillaud *et al.*, 2008). A partir de ces différentes études, il apparaît que la localisation de certains membres de la famille des *AtMAP65s* est complexe et controversée. La caractérisation biochimique de ces protéines est indispensable pour déterminer quelles fonctions dans l'organisation des réseaux de MTs dans les cellules acentrosomales de plantes sont associées à chaque membre de la famille *AtMAP65*.

Protéine	Espèce	Caractéristiques moléculaires <i>in vitro</i>	Localisation subcellulaire	Analyse <i>in vivo</i>	Fonction probable <i>in vivo</i>
NtMAP65-1a	Tabac	polymérisation de MTs, phosphorylable par MAPK et CDK	MTs corticaux, PPB, fuseau mitotique, phragmoplaste	la surexpression du mutant phosphorylable entraîne un retard d'expansion du phragmoplaste dans des cellules en culture	formation de faisceaux de MTs, expansion du phragmoplaste
NtMAP65-1b	Tabac	assemblage des MTs en faisceaux, promeut la polymérisation de MTs	non analysée	non analysé	formation de faisceaux de MTs
MAP65-1	Carotte	assemblage des MTs en faisceaux	MTs corticaux, PPB, fuseau mitotique, phragmoplaste	non analysé	formation de faisceaux de MTs
AtMAP65-1	<i>Arabidopsis</i>	assemblage des MTs de polarité opposée en faisceaux, phosphorylable par MAPK et CDK	MTs corticaux, PPB, MTs interdigités en anaphase, phragmoplaste	non analysé	rôle dans l'organisation du réseau cortical, maintien de la bipolarité du fuseau mitotique
AtMAP65-2	<i>Arabidopsis</i>	assemblage des MTs en faisceaux, stabilisation des MTs	MTs corticaux, PPB, MTs du fuseau mitotique, phragmoplaste	non analysé	formation de faisceaux de MTs
AtMAP65-3 /PLEIADE	<i>Arabidopsis</i>	non analysé	MTs corticaux, PPB, Fuseau mitotique, zone centrale du phragmoplaste	le mutant KO exhibe des défauts de la cytokinèse, des défauts de structure du phragmoplaste et une expansion anormale de sa zone centrale	rôle dans la cytokinèse, maintien de la bipolarité du fuseau mitotique, organisation du phragmoplaste
AtMAP65-4	<i>Arabidopsis</i>	non analysé	MTs à la périphérie du noyau en préprophase, MTs des pôles mitotiques, MTs du fuseau mitotique	non analysé	organisation du fuseau mitotique
AtMAP65-5	<i>Arabidopsis</i>	assemblage des MTs en faisceaux de polarité opposée	MTs corticaux, MTs à la périphérie du noyau en préprophase, PPB, MTs interdigités du fuseau mitotique, phragmoplaste	non analysé	rôle dans l'organisation du réseau cortical, maintien de la bipolarité du fuseau mitotique
AtMAP65-6	<i>Arabidopsis</i>	assemblage des MTs sous forme de grillage constitué de MTs individuels	mitochondrie	non analysé	positionnement des organelles
AtMAP65-8	<i>Arabidopsis</i>	non analysé	MTs des pôles mitotiques, MTs du fuseau mitotique	non analysé	dynamique de l'extrémité (-) des MTs
PRC1	Mammifères	assemblage des MTs en faisceaux antiparallèles, phosphorylables par CDK	dans le noyau en interphase, MTs de la zone centrale du fuseau mitotique	L'extinction de <i>PRC1</i> par RNAi dans des cultures cellulaires provoque des défauts de la cytokinèse, l'absence de partie centrale du fuseau mitotique. La surexpression du mutant non phosphorylable par MAPK entraîne un arrêt en métaphase	formation de faisceaux de MTs, organisation de la zone centrale du fuseau mitotique en présence d'une kinésine 4
SPD1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	non analysé	dans le noyau en interphase, périphérie des centrosomes, MTs de la zone centrale du fuseau mitotique	la perte de fonction de SPD1 entraîne une absence de la zone centrale du fuseau mitotique	maintien de la zone centrale du fuseau mitotique
Feo	Drosophile	non analysé	zone centrale du fuseau mitotique	L'extinction de <i>Feo</i> par RNAi entraîne la formation de faisceaux de la zone centrale du fuseau mitotique très fins et des défauts de la cytokinèse	maintien de la zone centrale du fuseau mitotique
Ase1p	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	assemblage des MTs en faisceaux antiparallèles, oligomérisation le long des MTs, phosphorylable par CDK	MTs cytoplasmiques, MTs du fuseau mitotique, SPB (équivalent des centrosomes), MTs interdigités du fuseau mitotique en anaphase	l'invalidation de Ase1p entraîne une hypersensibilité aux drogues dépolymérisant les MTs, une désorganisation des MTs interphasiques et des MTs astraux, des défauts du fuseau mitotique en anaphase et des défauts du positionnement du noyau	formation de faisceaux de MTs, organisation de la zone centrale du fuseau mitotique

Figure 12: Membres de la famille des MAP65/Ase1/PRC1 chez les eucaryotes.

4.2 *AtMAP65-4* une MAP à part

La localisation d'*AtMAP65-4* décrite par Van Damme *et al.*, (2004b) suggère une association pour cette MAP avec les MTs impliqués dans la division cellulaire. Il s'agit du premier cas décrit dans la littérature d'une MAP de plante strictement associée aux MTs du fuseau mitotique. Lors de cette localisation subcellulaire, les auteurs ont surexprimé *AtMAP65-4* fusionnée à la GFP et placé sous le contrôle d'un promoteur fort (35S). La localisation de la MAP est strictement limitée de la prophase à l'anaphase, tout d'abord en association avec les MTs qui s'organisent autour du noyau avant rupture de l'enveloppe nucléaire, puis avec les MTs du fuseau mitotique avant disparition du signal en fin de mitose. En 2008, les travaux de Smertenko *et al.*, (2008) décrivent une immunolocalisation d'*AtMAP65-4* dans des cellules en culture d'*Arabidopsis*. Leurs données montrent un marquage limité à la mitose mais essentiellement diffus. Cependant, un marquage plus intense avec les MTs de la zone centrale du fuseau mitotique en anaphase et du phragmoplaste en télophase semble se dégager. Ainsi si ces différents auteurs s'accordent sur la localisation d'*AtMAP65-4* avec des MTs uniquement en mitose, une controverse existe quant aux sous-populations de MTs avec lesquelles *AtMAP65-4* est associée. Par ailleurs, l'analyse des profils d'expression d'*AtMAP65-4* a montré une augmentation de l'activité de transcription lors de la phase S et surtout lors du passage de la cellule vers la mitose (Smertenko *et al.*, 2008). En conclusion, la localisation d'*AtMAP65-4* suggère un rôle pour cette protéine dans l'établissement ou le maintien de l'organisation des MTs du fuseau mitotique. En dehors de ces résultats, aucune donnée sur les propriétés moléculaires et fonctionnelles d'*AtMAP65-4* n'avait été décrite au début de mon travail de thèse.

Objectifs de la thèse

Le peu de données collectées quant aux propriétés d'*AtMAP65-4* et son possible rôle lors de la mise en place et/ou l'organisation du fuseau mitotique constituaient un défi très attractif pour débiter ma thèse. De plus, l'expertise du laboratoire dans l'étude du cytosquelette *in vitro* et plus précisément dans l'étude de la dynamique des MTs en présence de MAPs végétales est reconnue. Tout cela m'a apporté les garanties nécessaires avant de débiter les recherches sur les propriétés moléculaires et fonctionnelles d'*AtMAP65-4*.

Les objectifs de la thèse se sont articulés autour de 4 questions principales :

(i) Quelle est la localisation d'*AtMAP65-4* *in vivo* ? Et quelles fonctions peuvent être associées à la MAP ?

But : Déterminer de manière précise la localisation d'*AtMAP65-4* au cours de la mitose et attribuer un possible rôle *in vivo* à *AtMAP65-4* (travail effectué en collaboration avec D. Geelen et Daniel Van Damme, Gand – Belgique).

(ii) Quelles sont les propriétés biochimiques d'*AtMAP65-4* *in vitro*?

But : Caractériser les propriétés biochimiques d'*AtMAP65-4* sur l'organisation et la dynamique d'assemblage des MTs *in vitro*.

(iii) Comment est régulée l'activité d'*AtMAP65-4*?

But : Débiter l'étude de la régulation de l'activité d'*AtMAP65-4* par phosphorylation par les kinases Auroras.

(iv) Modélisation de l'activité d'*AtMAP65-4* et analyse comparative avec *AtMAP65-1*

But : Réunir les paramètres dynamiques obtenus grâce aux tests d'activités *in vitro* afin de modéliser l'activité d'*AtMAP65-4*, tester des hypothèses *in silico* quant aux mécanismes moléculaires mis en jeu par *AtMAP65-4* pour organiser les MTs en faisceaux.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai étudié, dans une première étape, les propriétés moléculaires et fonctionnelles d'*AtMAP65-4*. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans l'article de recherche accepté pour publication dans le journal *The Plant Cell*. J'ai poursuivi ce travail en recherchant des protéines partenaires pouvant moduler l'activité d'*AtMAP65-4*. Ceci m'a conduit à analyser l'effet de la phosphorylation par des kinases Auroras d'*Arabidopsis* sur l'activité d'*AtMAP65-4*. Dans une seconde partie, en collaboration dans l'équipe avec Jean-Louis Martiel et Virginie Stoppin-Mellet, nous avons modélisé l'activité d'*AtMAP65-4* et *AtMAP65-1*. Ce travail nous a permis de tester des hypothèses quant au mode de liaison de ces MAPs aux MTs et à leur effet sur la dynamique des MTs dans les faisceaux qu'elles induisent. Cette partie est présentée sous la forme d'un soumis (Cf Chapitre III).

CHAPITRE I

Etude des propriétés moléculaires et fonctionnelles d'*AtMAP65-4*.

1. Introduction

Chez *Arabidopsis thaliana*, la famille des MAP65s se compose de 9 isoformes. Ces protéines possèdent des régions pour lesquelles leurs homologues de séquence sont grandes notamment dans le domaine de liaison aux MTs, mais aussi des régions divergentes, comme par exemple la région C-terminale. Cette variabilité peut refléter la localisation particulière de chacun des membres de cette famille et leurs rôles physiologiques distincts. Dans ce contexte, *AtMAP65-4* apparaît comme étant particulièrement intéressante du fait de sa localisation spécifique en mitose. Nos recherches se sont d'abord portées sur la localisation d'*AtMAP65-4* *in vivo*. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Danny Geelen et Daniel Van Damme (Gand, Belgique). Dans un second temps, j'ai étudié les propriétés biochimiques d'*AtMAP65-4* *in vitro* et son effet sur le comportement dynamique des MTs par des observations en microscopie à onde évanescente (TIRFM). L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans l'article de recherche publié dans le journal *The Plant Cell*.

2. Résumé de l'article

« *AtMAP65-4*, protéine associée aux fibres kinétochoriennes,

induit la formation de faisceaux de microtubules ainsi que leur élongation *in vitro* »

Le fuseau mitotique des cellules de plante possède une architecture particulière : (i) il ne possède pas de centrosomes, (ii) sa localisation et son orientation sont contrôlées au sein de la cellule par une structure unique, l'anneau préprophasique. La présence de ces éléments distincts est complétée par l'activité de MAPs et de moteurs moléculaires spécialisés. Notre travail décrit comment *AtMAP65-4*, une MAP qui est membre de la famille des MAP65s, s'associe spécifiquement aux MTs lors de la mise en place du fuseau mitotique en prophase, puis avec les fibres kinétochoriennes jusqu'à la fin de l'anaphase. *In vitro*, *AtMAP65-4* induit

la formation de faisceaux de MTs en formant des ponts entre deux MTs adjacents et ce, quelle que soit leur polarité. L'association d'*AtMAP65-4* est concomitante de l'élongation du faisceau de MTs. De plus, *AtMAP65-4* module les paramètres d'instabilité dynamique des MTs au sein des faisceaux essentiellement en diminuant la fréquence des événements de catastrophe et en favorisant les événements de sauvetage. Ces caractéristiques sont en corrélation avec la dynamique de formation des fibres kinétochoriennes pendant la formation du profuseau mitotique.

3. Article

***Arabidopsis* Kinetochore Fiber-Associated MAP65-4 Cross-Links Microtubules and Promotes Microtubule Bundle Elongation**

Vincent Fache,^a Jérémie Gaillard,^a Daniel Van Damme,^{b,c} Danny Geelen,^d Emmanuelle Neumann,^e Virginie Stoppin-Mellet,^a and Marylin Vantard^{a,1}

^aInstitut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique/Centre National de la Recherche Scientifique/Institut National de la Recherche Agronomique/Université Joseph Fourier, 38054 Grenoble, France

^bDepartment of Plant Systems Biology, VIB, B-9052 Ghent, Belgium

^cDepartment of Plant Biotechnology and Genetics, Ghent University, B-9052 Ghent, Belgium

^dDepartment of Plant Production, Ghent University, B-9000 Ghent, Belgium

^eInstitut de Biologie Structurale, Commissariat à l'Energie Atomique/Centre National de la Recherche Scientifique/Université Joseph Fourier, 38027 Grenoble, France

The acentrosomal plant mitotic spindle is uniquely structured in that it lacks opposing centrosomes at its poles and is equipped with a connective preprophase band that regulates the spatial framework for spindle orientation and mobility. These features are supported by specialized microtubule-associated proteins and motors. Here, we show that *Arabidopsis thaliana* MAP65-4, a non-motor microtubule associated protein (MAP) that belongs to the evolutionarily conserved MAP65 family, specifically associates with the forming mitotic spindle during prophase and with the kinetochore fibers from prometaphase to the end of anaphase. In vitro, MAP65-4 induces microtubule (MT) bundling through the formation of cross-bridges between adjacent MTs both in polar and antipolar orientations. The association of MAP65-4 with an MT bundle is concomitant with its elongation. Furthermore, MAP65-4 modulates the MT dynamic instability parameters of individual MTs within a bundle, mainly by decreasing the frequency of catastrophes and increasing the frequency of rescue events, and thereby supports the progressive lengthening of MT bundles over time. These properties are in line with its role of initiating kinetochore fibers during prospindle formation.


INTRODUCTION


In plant cells, microtubule (MT) cytoskeleton arrays provide a molecular framework for various cellular processes, including cell morphogenesis, establishment of cell polarity, and cell division (Ehrhardt, 2008). Higher plant MT arrays do not emanate as radial arrays from a well-defined MT-organizing center (i.e., the centrosome). Instead, they are composed mainly of MT bundles, which are highly dispersed within the cell cortex during interphase (and known as cortical MTs) or organized as a mitotic spindle during cell division. In addition, plant cells organize a ring of MT bundles at the onset of mitosis, called the preprophase band (PPB). This PPB defines the future division plane and the position of interdigitated MT bundles at the midzone during cytokinesis, a structure referred to as the phragmoplast. The bundling of MTs is a crucial step in the formation and stabilization of MT arrays throughout the cell cycle and hinges on the ability of

the cytoskeleton to auto-organize into higher-order structures. Although the basic MT behavior necessary for creating and organizing cortical MT bundles has been revealed by dynamic imaging and genetic studies (Ehrhardt, 2008; Wasteney and Ambrose, 2009), our knowledge of the organization and functioning of MT bundles within the acentrosomal plant mitotic spindle is limited (Bratman and Chang, 2007). The cortical array is a self-organizing cortical network that arranges its MTs via a sequence of events: MT nucleation at dispersed sites within the lattice of preexisting MTs (Murata et al., 2005; Chan et al., 2009), release of MTs from their nucleation sites (Shaw et al., 2003; Stoppin-Mellet et al., 2006), and transport of the MTs by a hybrid treadmilling mechanism (Shaw et al., 2003). The angle at which MTs encounter other MTs determines the outcome of the MT interaction; it can cause catastrophe, severing, crossover, or bundling (Shaw et al., 2003; Dixit and Cyr, 2004). The cumulative effect of these outcomes underpins the self-ordering characteristics of the MT networks and forms the basis of the properties of the different arrays (Wasteney and Ambrose, 2009). MT bundling is particularly important during mitosis because it facilitates polarity establishment of the acentrosomal bipolar spindle by selectively stabilizing polar and antipolar MTs. Several types of proteins and cellular structures play a role in grouping or bundling MTs together. The kinetochores are the docking sites for the MT plus ends, bridging MTs together that make up a kinetochore

¹ Address correspondence to marylin.vantard@cea.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Marylin Vantard (marylin.vantard@cea.fr).

 Online version contains Web-only data.

 Open Access articles can be viewed online without a subscription. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.110.080606

fiber (McDonald et al., 1992). At the minus end, plants do not attach the kinetochore MTs to a spindle pole body or a centrosome. Instead, pole focusing of the kinetochore fibers has been proposed to rely on minus end-directed motors that may form cross-links between individual MTs (Smirnova et al., 1998; Chen, 2002; Ambrose et al., 2005). Selective cross-linking of non-kinetochore MTs takes place at the spindle midzone and maintains spindle bipolarity. *Arabidopsis* kinesin-14 (ATK5), which belongs to the kinesin-14 family, is thought to mediate lateral interactions to align MTs into linear bundles in regions of overlap between interpolar MTs (Ambrose and Cyr, 2007). Another group of proteins that bundle MTs in vitro, namely, the MAP65 family in plants, and its homologs, Ase1 in fungus (Janson et al., 2007) and PRC1 in mammals (Mollinari et al., 2002), have been implicated in these interactions. In the plant model *Arabidopsis thaliana*, nine members of this family were identified that share between 28 and 79% amino acid identity (Hussey et al., 2002). To date, only *Arabidopsis* MAP65-1, MAP65-5, and MAP65-2 have been shown to induce MT bundling in vitro (Chan et al., 1999; Smertenko et al., 2004; Gaillard et al., 2008; Li et al., 2009). Electron microscopy of MAP65-1 and MAP65-5 in in vitro preparations showed the formation of filamentous cross-bridges at regular intervals along MT walls with an angle of 60° between antipolar MTs (Gaillard et al., 2008). In vivo, MAP65-1 and MAP65-5 MT bundles are associated with the cellular cortex and the interzonal region during anaphase (Chan et al., 1999; Smertenko et al., 2004; Gaillard et al., 2008). MAP65-2 induces stable MT bundles in vitro and is localized with almost all of the MT arrays present in plant cells (Li et al., 2009). The biochemical properties of the remaining MAP65s are not known, and most studies have focused on their subcellular localization using antibodies and green fluorescent protein (GFP) tagging. MAP65-3 is associated with the mitotic spindle during both early and late mitosis in all *Arabidopsis* organs (Müller et al., 2004; Caillaud et al., 2008). MAP65-4 localization has been associated with the metaphase and anaphase spindle MTs when fused to GFP in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells (Van Damme et al., 2004), whereas it has been described to localize at the midzone of the spindle during anaphase and with phragmoplast MTs using immunostaining methods (Smertenko et al., 2008). Immunostaining methods have localized MAP65-6 to mitochondria (Mao et al., 2005) or to the anaphase spindle (Smertenko et al., 2008). On the basis of these different studies, it appears that, for at least some members of the *Arabidopsis* MAP65 family, their localization within cells is rather complex. Further biochemical characterization of MAP65 proteins will be required to establish what function individual members play in the organization of the acentrosomal MT cytoskeleton.

Here, we report on the biochemical and functional properties of MAP65-4. In vitro, MAP65-4-bundled MTs maintained an intermicrotubule spacing of ~15 nm, and the angle between MAP65-4 and the MT lattice was 90°. Further analysis of the dynamic behavior of individual MTs within MAP65-4 bundles revealed that it regulates dynamic instability of MTs mostly by decreasing catastrophe and increasing rescue events. Interestingly, the duration of depolymerization phases was shortened and that of elongation phases was increased, supporting the progressive lengthening of MT bundles over time. In vivo,

MAP65-4 is strictly localized with MTs during mitosis, specifically with MTs of the forming mitotic spindle during prophase and with the kinetochore fibers from prometaphase to the end of anaphase. Thus, our observations argue that MAP65-4 mediates lateral interactions between spindle MTs, where it may participate in the formation and dynamics of MTs within kinetochore fibers.

RESULTS

MAP65-4 Is Localized to Kinetochore Fibers during Mitosis

To identify the MT array with which MAP65-4 is associated, the cellular distribution of GFP-tagged recombinant protein was investigated in tobacco BY-2 cells (Figure 1; see Supplemental Movies 1 and 2 online). In the more than 100 independent transgenic lines analyzed, GFP-AtMAP65-4 expression was detected in mitotic cells (see Supplemental Figure 1A and Supplemental Movies 1 and 2 online). The majority of interphase cells did not fluoresce, and ~10% of the lines showed weak fluorescence in the nucleus (Figure 1B). In contrast with the MT binding preference of other members of the MAP65 family analyzed to date (Caillaud et al., 2008; Gaillard et al., 2008; Li et al., 2009), MAP65-4 was not associated with MTs of the PPB (Figure 1A). MAP65-4 localized exclusively to the perinuclear MTs in early prophase cells (Figure 1B). Upon bipolarization of the perinuclear MT array, MAP65-4 started to accumulate at the two sides of the nucleus that corresponded to the future poles of the spindle (Figure 1B; see Supplemental Figure 1B and Supplemental Movies 1 and 2 online). Later on, during nuclear envelope breakdown (NEB), GFP-MAP65-4 was associated with MTs that invaded the nuclear space (Figure 1C; see Supplemental Movies 1 and 2 online). In fully matured spindles, GFP-MAP65-4 was associated with the kinetochore fibers (Figure 1E). During cytokinesis, in some cells, weak GFP-AtMAP65-4 signal was observed at the level of the cell plate (Figure 1B). Quantification of the GFP fluorescence signal intensity showed that the levels increased from preprophase to anaphase and then rapidly decreased, suggesting proteolytic removal of GFP-MAP65-4 at the end of anaphase to early telophase (see Supplemental Figure 1 online).

AtMAP65-4 Induces MT Bundling in Vitro

To investigate the biochemical properties of MAP65-4 in vitro, recombinant His-MAP65-4-His and GFP-MAP65-4-His proteins were purified as previously described (Gaillard et al., 2008). Incubation of His-MAP65-4-His (from 0.1 to 0.5 μ M) with taxotere-stabilized Alexa488-labeled MTs (0.5 μ M) stimulated the formation of MT bundles (Figure 2A, a to c). GFP-MAP65-4-His was equally active than on MAP65-4 fused to GFP in bundling MTs and homogeneously stained MT bundles (see Supplemental Figure 2 online). Single MT strands did not accumulate MAP65-4, suggesting that bundling of the MTs stabilized the MT-MAP65-4 interactions. Analyses of electron micrographs of MAP65-4-induced bundles showed that MTs were parallel to each other and separated by 15-nm cross-bridges (Figure 2B, a to c). The cross-bridges formed a lattice that was equally spaced along MT

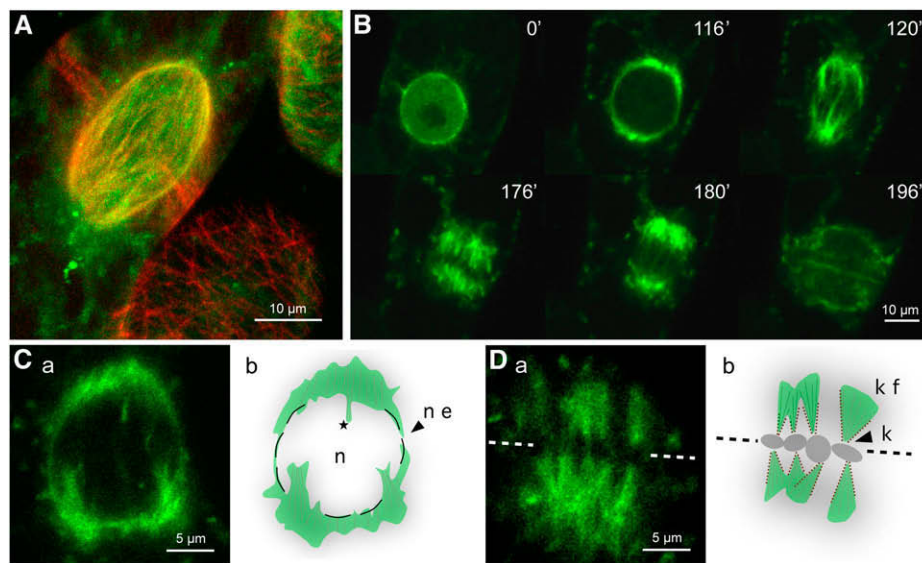


Figure 1. MAP65-4 Localizes to the Forming Mitotic Spindle and Kinetochore Fibers

(A) Dual labeling of tobacco BY-2 cells expressing MAP65-4-GFP and RFP-TUA6. During prophase, MAP65-4-GFP strongly bound perinuclear MTs (top left cell). In interphase cells, MAP65-4 did not associate with the cortical MT network (bottom right cell).

(B) Time-lapse recording of tobacco BY-2 cells expressing MAP65-4-GFP during cell division. From G2 ($t = 0$) to prophase ($t = 116'$), MAP65-4-GFP accumulated at the perinuclear MT basket. At the prophase/prometaphase transition, the MTs reorganized and formed two poles from which MT bundles emanated toward the liberated chromosomes ($t = 120'$). AtMAP65-4 labeled the kinetochore MTs as the spindle formed, from prometaphase ($t = 176'$) to late anaphase ($t = 180'$).

(C) and **(D)** MAP65-4-GFP localization during nuclear envelope breakdown **(C)** and metaphase **(D)**. **(Cb)** and **(Db)** are cartoon representations of **(Ca)** and **(Da)**, respectively. n, nucleus; ne, nuclear envelope; star, MTs that invade the nuclear space; k, kinetochore; kf, kinetochore fiber. The equatorial plane is defined by the dotted line and chromosomes are represented by gray circles.

walls, at a distance of 15 to 17 nm for a 1:1 stoichiometric ratio of tubulin dimers and MAP65-4. This distance corresponds to the binding of one MAP65-4 protein every second tubulin dimer. The angle between the cross-bridges relative to the MT axis was 90° .

In a complementary series of experiments, we performed a truncation analysis of MAP65-4 to identify domains responsible for MT binding and bundling. Three different domains corresponding to the N-terminal, the central, and the C-terminal regions of MAP65-4 (referred to as domains 1, 2, and 3, respectively) were defined on the basis of the amino acid sequence alignment of MAP65s (Figure 3). In addition, domain 3 (the C-terminal region) was subdivided in two domains: the N-terminal part, which includes the most evolutionarily conserved domain of the MAP65 family (referred to as to 3N), and the C-terminal part, which is divergent among the MAP65 members (referred as to 3C) (Figure 3A). High-speed centrifugation of MAP65-4 and of truncated proteins after incubation with MTs demonstrated that MT binding activity is localized to 3N (see Supplemental Figure 3 online). Hence, the MT binding domain of MAP65-4 is located in the evolutionarily conserved part of MAP65s, in agreement with the position of the MT binding domain in MAP65-1 and MAP65-5 (Gaillard et al., 2008). In addition, the efficiency of MT bundling by the different full-length and truncated MAP65-4 proteins was assayed by low-speed centrifugations that allowed single MTs to remain in the supernatant, while bundled MTs were sedimented (Figure 3B), and by fluorescence microscopy imaging assays

(Figure 3C). These experiments revealed that the N-terminal, the central, and the 3N domains independently contributed to the MT bundling activity, whereas the 3C domain did not (Figure 3).

To discriminate between the amino acid sequences involved in MT bundling and MT binding in the 3N domain, we produced three different peptides with deletions in the N- or C-terminal part of this domain (sequences 338 to 452 amino acids, 320 to 452 amino acids, and 338 to 476 amino acids), and MAP65-4 deleted of the sequence amino acids 440 to 472 [MAP65-4 ($\Delta 440-472$)] (see Supplemental Figure 3 online). None of these constructs were able to bind to MTs. Thus, the 3N domain as defined in this study is strictly necessary for the binding of MAP65-4 to MTs and is involved in MT bundling activities.

MAP65-4 Affects MT Dynamics within Bundles

To elucidate the molecular mechanisms by which MAP65-4 generates MT bundles and influences their dynamics, we developed a real-time *in vitro* assay in which the dynamic instability behavior of individual MTs within bundles could be determined. This was done by implementing a dual-color total internal reflection fluorescence (TIRF) assay in reconstitution experiments (described in Methods). Alexa568-labeled tubulin was polymerized in the presence of GMPCPP to obtain stable MT seeds that were incubated with $0.1 \mu\text{M}$ MAP65-4. Short bundles were produced, referred as to MT seed bundles, which were

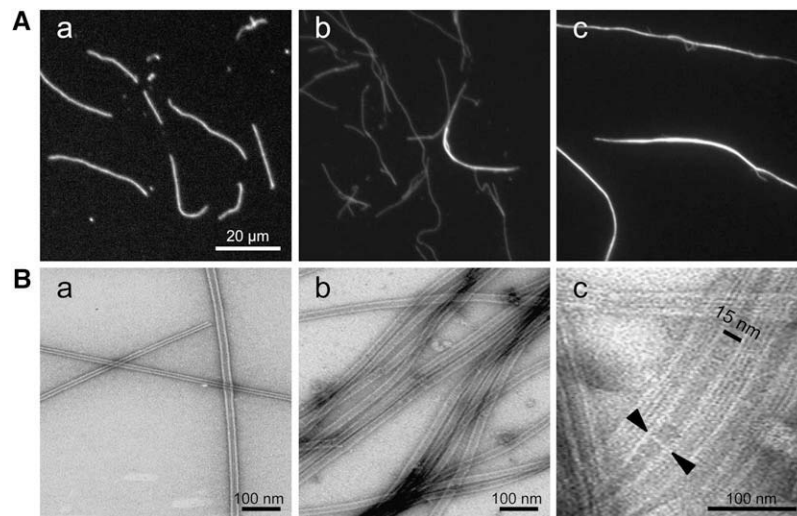


Figure 2. MAP65-4 Induces MT Bundling through the Formation of 15-nm Cross-Bridges in Vitro.

(A) Rhodamine-labeled taxotere-stabilized MTs (0.5 μM) incubated in the absence **(a)** or presence of 0.1 μM **(b)** and 0.5 μM **(c)** AtMAP65-4. **(B)** Negatively stained electron microscopy of MTs alone **(a)** or in the presence of MAP65-4 **(c)**. High-magnification view of MT bundles **(d)** shows MAP65-4 forming extensive inter-MT bridges of 15 nm (arrows). The bridges are oriented at an angle of $\sim 90^\circ$ relative to the lattice of MTs.

elongated by the addition of Alexa488-labeled tubulin and various concentrations of MAP65-4 (Figure 4A). As controls, single MT seeds were elongated by Alexa488-labeled tubulin in the absence of MAP65-4. This allowed us to determine the dynamic parameters of both MT ends of single MTs (Figure 4B, 1). At a given tubulin concentration, growth occurred mainly from the plus end, as expected, and could readily be visualized in kymographs (Figure 4B; see Supplemental Movie 3 online). The life history of the dynamic MT parameters at both MT ends is represented by triangles (in green) and the seed itself by a red line. Two of the three sides of the triangle represent an increase and decrease, respectively, in MT length over time. MTs within a bundle can be viewed as a superposition of several MT triangles (Figure 4B, 3).

The observation that MT bundle seed elongation occurs at similar rates at both ends suggests that MAP65-4-associated MTs have opposite polarity (Figure 4B, 2; see Supplemental Movie 4 online). To determine whether this polarity preference was an intrinsic property of MAP65-4, we analyzed mainly kymographs of MT bundles that have less than six MTs to allow the observation of MT minus ends; the MT ends of MT bundles that contain more MTs are embedded in the kymographs, rendering their detection difficult (Figure 4C, 2). The analysis showed that MT polarity within bundles was random, indicating that AtMAP65-4 bundled polar as well as antipolar MTs in vitro (Figure 4C).

We then examined if the presence of MAP65-4 would modify the dynamic parameters of bundled MTs. First, we measured the elongation and shortening speeds of the plus and minus ends of MTs assembled in the presence of various concentrations of MAP65-4 (Figure 5A). Single MTs showed a mean growth speed of 1.71 ± 0.24 μm/min and a mean shrinkage speed of 16.55 ± 4.99 μm/min at their MT plus end. The addition of 0.5 μM

MAP65-4 did not change these parameters significantly (mean growth of 1.93 ± 0.29 μm/min and mean shrinkage of 17.27 ± 5.88 μm/min). At the minus ends, single MTs showed a mean growth of 0.96 ± 0.32 μm/min and a mean shrinkage speed of 17.3 ± 3 μm/min, and when bundled, they grew at a speed of 0.71 ± 0.28 μm/min and shrank at a speed of 22.1 ± 10.1 μm/min. In conclusion, the elongation and shrinking rates were similar to values reported for single MTs and indicated that the bundling of MTs by MAP65-4 did not significantly affect their speed of elongation or shortening.

Next, we measured the frequency of catastrophe and rescue events of MTs when cross-linked by MAP65-4. These frequencies were defined as the ratio of catastrophe and rescue events during one measurement (recordings of ~ 25 min). For rescue events, we considered only situations of MT regrowth when the MTs did not depolymerize completely to the original seeds or seed bundles. Indeed, in our experimental set up, MT shrinkage down to MT seeds did not induce the complete disappearance of MTs, as the seeds were stabilized. Thus, MT regrowth from MT seeds could not be considered as a rescue event but rather as the assembly of a new MT. Increasing MAP65-4 concentrations from 0 to 0.5 μM led to a 36% ($n = 29$) reduction in catastrophe events at the MT plus ends and a 52.7% ($n = 29$) reduction at the MT minus ends within bundles (Figure 5B). In addition, the presence of 0.5 μM MAP65-4 led to an increase of 51% ($n = 29$) of rescue events at the MT plus ends and of 23.9% ($n = 29$) at their minus ends (Figure 5C). These measurements showed that, in the presence of MAP65-4, the frequency of catastrophe events for both MT ends decreased, whereas the frequency of rescue events at MT plus ends significantly increased. As a consequence, the duration of MT elongation in presence of 0.5 μM MAP65-4 increased on average from 3.5 min ($n = 173$) to 7.0 min ($n = 106$) for MT plus ends and from 5.0 min ($n = 109$) to 12.4 min

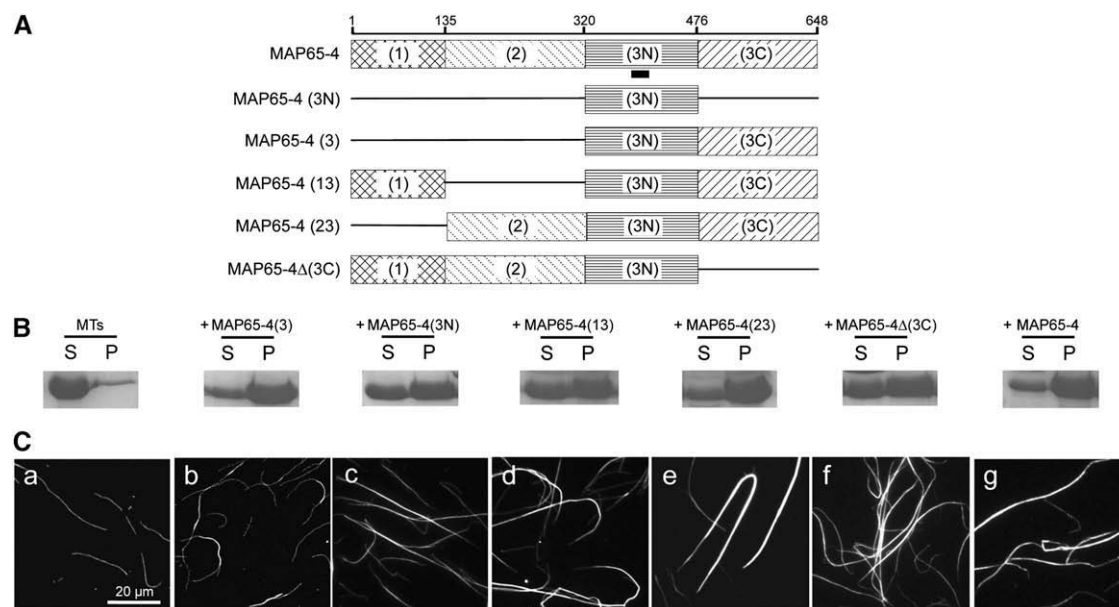


Figure 3. Identification of Functional Domains of MAP65-4 on MT Bundling Activity in Vitro.

(A) Diagrams of full-length MAP65-4 and its truncated domains. The conserved motif is underlined.

(B) Bundled MTs and individual MTs were separated by low-speed centrifugation, and pellets (P) and supernatants (S) were analyzed by SDS-PAGE. Full-length MAP65-4 and its different domains ($1 \mu\text{M}$) were incubated with $5 \mu\text{M}$ MTs.

(C) Rhodamine-labeled taxotere-stabilized MTs were incubated in the absence **(a)** or presence of MAP65-4(3) **(b)**, MAP65-4(3N) **(c)**, MAP65-4(13) **(d)**, MAP65-4(23) **(e)**, MAP65-4($\Delta 3\text{C}$) **(f)**, or MAP65-4 **(g)**. All of the proteins containing the 3N domain induced MT bundling.

($n = 48$) for MT minus ends (Figure 5D). These data are consistent with the observations showing that MT rescue events increased, whereas MT catastrophe events decreased in the presence of MAP65-4 (Figures 5A to 5C).

Finally, we examined the duration of the interval between catastrophe and rescue events. For that, we measured the length of MTs after a catastrophe event and calculated the ratio between the MT depolymerized lengths and the total distance between MT ends and the MT seed bundles (illustrated on kymographs, Figure 5E). The results are expressed as the distribution of the relative MT depolymerized lengths of all analyzed MTs (Figure 5F). In the absence of MAP65-4, the MT plus ends depolymerized after a catastrophe event by at least 80% of their initial lengths, whereas in presence of $0.5 \mu\text{M}$ MAP65-4, MT plus ends did not depolymerize for no more than 50% of their initial lengths. Moreover, after a catastrophe event, single MTs always depolymerized more than 40 to 50% of their initial length, whereas MTs cross-linked by MAP65-4 might depolymerize <20% of their initial length (Figure 5F). As a result, the duration of the shortening phase of MTs bundled by MAP65-4 was decreased compared with that of single MTs, leading to regular growth of MT bundles over time. These measurements were difficult to obtain for MT minus ends, as they were short and it was difficult to identify them precisely when the number of MTs within a bundle was high. Although the duration of MT shortening between catastrophe and rescue events could sometimes be measured and indicated that MTs tended to decrease their depolymerized length after a catastrophe event, the sample size

was insufficient to draw a meaningful comparison with single MTs. Together, these data indicate that MAP65-4 induced a change in dynamic MT behavior; for example, when MTs were organized in bundles by MAP65-4, they exhibited a decrease in their intrinsic dynamic instability, leading to persistent bundle growth. Analysis of the collective dynamic behavior of MTs within a bundle induced by MAP65-4 showed that, for MAP65-4 concentrations of above $0.25 \mu\text{M}$, the distance between mean and maxima MT lengths decreased, and this may indicate a global synchronization of MT polymerization within a bundle (see Supplemental Figure 4 online).

In the assays, we observed physical collisions between growing MT bundles (see Supplemental Movie 5 online). When a growing MT bundle end encountered another MT bundle, we observed different responses: the growing MT bundle crossed over the resident MT bundle and continued to grow in 88% of the observed encounters ($n = 173$); underwent catastrophe, which impeded crossing over (7%, $n = 14$); paused (4%, $n = 7$); or coaligned with the resident MT bundle to form a thicker MT bundle (1%, $n = 2$). Coalignment was observed when MTs collided at a shallow angle (< 10° ; see Supplemental Movie 5 online). The crossing over events were independent of the angle of encounter between two MT bundles.

Dynamics of MAP65-4 MT Binding

We next examined the binding of MAP65-4 on MTs during MT bundle growth (Figure 6). Line scans and kymographs of

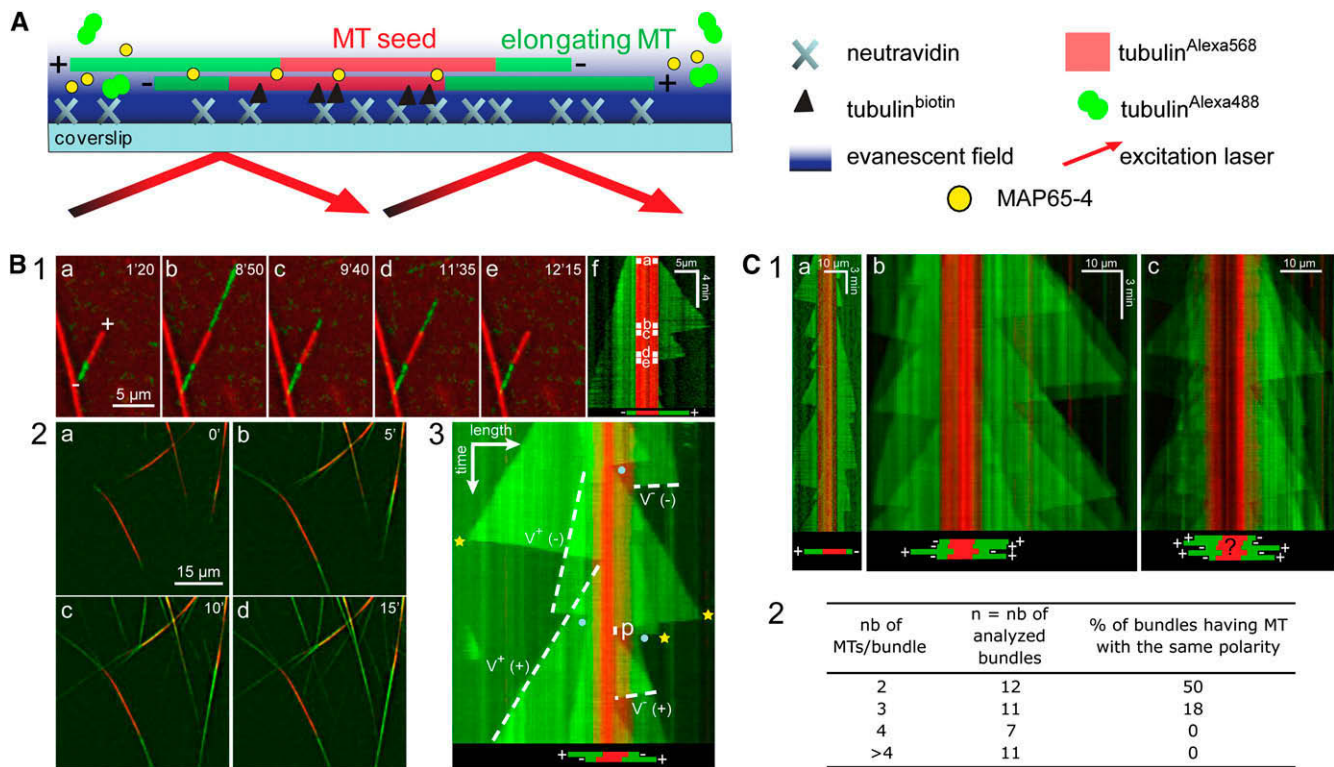


Figure 4. TIRF Microscopy Analysis of MT Polarity within Bundles Induced by MAP65-4.

(A) Diagram of the experimental setup: dynamic elongation of Alexa488-MTs (green) from stabilized GMPCPP Alexa568-MT seed bundles (red) in the presence or the absence of MAP65-4. Seeds (individual MTs or MT bundles referred to as MT seed bundles) were attached to the cover slip via a biotin-tubulin/avidin link. The experiments were performed at 32°C.

(B1) Dual-view image series of an individual MT: the seed (red, 0.3 μ M) was elongated by the addition of Alexa488-labeled tubulin (green, 22 μ M). **(a)** to **(e)** Images extracted from the time-lapse series (see Supplemental Movie 3 online) show the dynamic instability behavior of the elongating MT at both ends. The associated kymograph **(f)** displays the MT elongation/shortening and catastrophe/rescue events.

(B2) Dual-view image series (**[a]** to **[d]**) of MT bundles: seed bundles (0.3 μ M) were grown by adding Alexa488-labeled tubulin (22 μ M) in the presence of AtMAP65-4 (0.15 μ M). After 15 min **(d)**, a dense network of MT bundles was assembled.

(B3) Kymograph example from an elongating MT bundle composed of two MTs. On this kymograph, MT assembly parameters in the presence of MAP65-4 can be determined at both ends (dashed lines): polymerization rate (v^+) and depolymerization rate (v^-), catastrophe/rescue frequencies (yellow stars/blue dots), and duration of pauses (p).

(C1) Analysis of MT polarity within bundles induced by MAP65-4. Kymograph of a single MT **(a)** and MAP65-4-induced MT bundles **(b)** and **(c)**.

(C2) Determination of MT polarity within MT bundles. nb, number. These data demonstrate that the polarity within bundles induced by MAP65-4 is random.

elongating MTs in the presence of GFP-AtMAP65-4 showed that the accumulation of GFP-MAP65-4 along MTs was concomitant with MT polymerization (Figure 6A). In the experimental setup used, the binding of GFP-MAP65-4 to MTs followed polymerization by <2 s, as illustrated by the fluorescent position of Alexa568-labeled tubulin and GFP-MAP65-4 on the kymograph in Figure 6A. In the following experiments, we investigated the turnover rate of MAP65-4 binding to MTs by means of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP; Figure 6B). After photobleaching of GFP-MAP65-4, no fluorescence recovery was observed within 30 min in the presence of an excess amount of GFP-MAP65-4. By contrast, GFP-MAP65-4 was incorporated into newly formed MT bundles, indicating that active GFP-MAP65-4 was available throughout the experiment. To confirm that the absence of FRAP was caused by a low MAP65-4

recovery, MT bundles were polymerized for 20 min in the presence of MAP65-4 rather than GFP-MAP65-4 and incubated with GFP-MAP65-4. Once again, we did not observe any exchange of MAP65-4 protein at the MT bundles after 30 min. We therefore conclude that, *in vitro*, the dissociation parameter (k_{off}) of AtMAP65-4 for MTs is very low ($<5.6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

DISCUSSION

The acentrosomal plant mitotic spindle has unique structural properties, such as the absence of the equivalent of two opposing centrosomes at poles and the presence of a connective preprophase band that regulates the spatial and temporal framework for spindle mobility and bipolar spindle establishment.

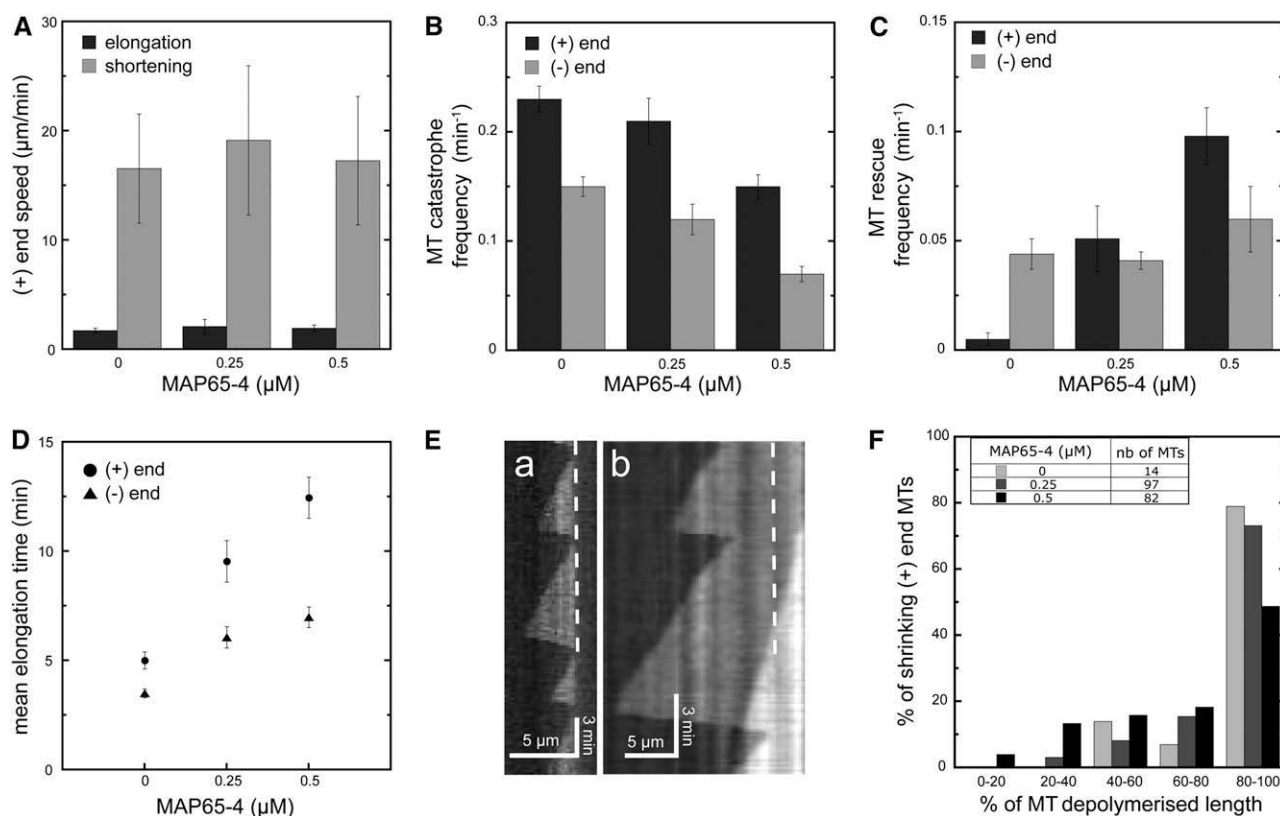


Figure 5. Effects of MAP65-4 on the Dynamic Parameters of MTs within Bundles.

(A) Histogram of the mean elongation and shortening speeds of MT plus ends when bundled by MAP65-4 ($n \geq 20$). Error bars indicate SD.
 (B) Catastrophe frequencies measured at the minus and plus ends of MT bundled by different MAP65-4 concentrations. Error bars indicate SE ($n \geq 10$). MAP65-4 decreases the frequency of catastrophe and rescue events at both MT ends.
 (C) Rescue frequencies measured at the MT minus and plus ends in the presence of various concentrations of MAP65-4. Error bars represent SE ($n \geq 6$). MAP65-4 has no significant effect on rescue frequencies at the MT minus ends but increases rescue frequencies at the MT plus ends.
 (D) Plot of the mean elongation duration of MTs at their plus ends and minus ends when bundled or not by MAP65-4. Error bars indicate SE ($n \geq 38$). MT elongation time increased when MTs were cross-linked by MAP65-4.
 (E) Kymographs showing the dynamics of a MT plus end of a single MT (a) or of a MT within a bundle (b). Dashed lines delimited MT seed boundary
 (F) Histogram illustrating the ratio of the depolymerization rate of the plus ends of single MTs to that of MTs cross-linked by MAP65-4. In the absence of MAP65-4, MT depolymerization occurs mostly until the nonhydrolyzable seed (80% of MT shrinkage events), whereas this occurs in only 50% of MTs cross-linked by MAP65-4.

These properties are most likely a reflection of the characteristics of microtubule-associated proteins (MAPs) and motors. Here, we show that MAP65-4, a MAP that belongs to the MAP65 family, associates with the early mitotic spindle and the kinetochore fibers from prometaphase to anaphase. In vitro, MAP65-4 induces MT bundling through the formation of cross-bridges between adjacent MTs. Furthermore, we were able to set up an assay to determine that MAP65-4 modulates the dynamic instability parameters of individual MTs within a MT bundle.

MAP65-4 Cross-Links MTs in Vitro

In a previous study, we demonstrated that MAP65-1 and MAP65-5, two other members of the MAP65 family, form a fishbone lattice between antipolar MTs in vitro (Gaillard et al., 2008), and more recently Subramanian et al. (2010) showed that

PRC1, the mammalian homolog of MAP65-1, exhibits an identical distribution. MAP65-4 also forms cross-bridges between adjacent MTs, but importantly the cross-bridges (15 nm) are significantly shorter than those generated by MAP65-1/MAP65-5 (30 to 40 nm), despite the proteins having a similar molecular weight and their domains upstream of the MT binding domain being approximately identical in size. The cross-bridges are implanted on the MT lattice at an angle of 90°. Hence, the binding of MAP65-4 to the MT lattice is not stereochemically hindered to interact with polar or antipolar MTs. Indeed, the orientation at which the MTs occurred within MAP65-4 induced bundles was random, indicating that the binding of MAP65-4 to MTs does not favor polar or antipolar MTs (Figure 4C, 2). In live cells, MAP65-4 is preferentially associated with MTs oriented toward the poles, as it localizes at the two polar halves of the forming spindle and with the kinetochore fibers, which point the minus ends toward

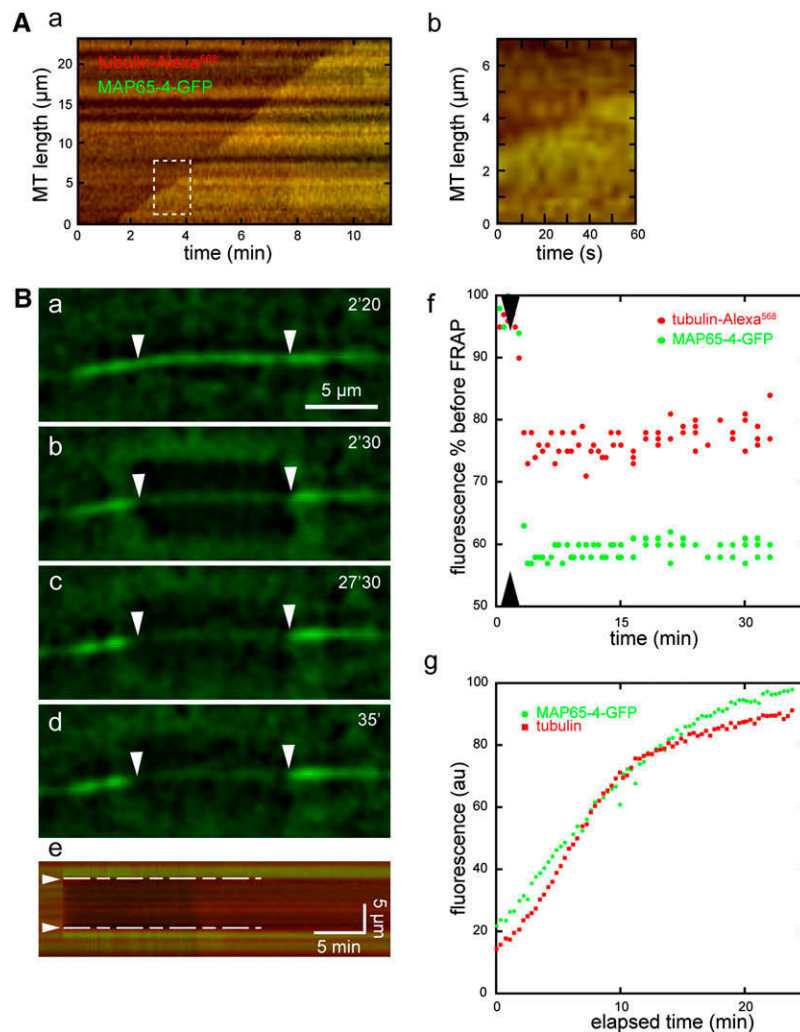


Figure 6. MAP65-4 Binds Rapidly and Durably to Elongating MT Bundles.

(A) Merged kymograph of an elongating MT bundle labeled with Alexa568-tubulin and GFP-AtMAP65-4 (a). An enlargement of the boxed area is shown in (b). MAP65-4 binding is concomitant with MT bundle elongation.

(B) Time-lapse series ([a] to [d]) of a photobleached MT bundle and its associated kymograph (e). GFP-MAP65-4 and Alexa568-tubulin fluorescence levels measured by line scans (f) of the photobleached area ([e]; between broken lines). GFP-MAP65-4 fluorescence does not recover after photobleaching (g). Tubulin polymerization and binding of free GFP-MAP65-4 during the assay. These measurements were performed on the entire field of view ($\sim 8.10^{-3}$ mm²) over a 25-min period.

the poles. We therefore speculate that other proteins and/or mechanisms, such as the localization of MT nucleation sites, regulate MT orientation in the early spindle and that their bundling by AtMAP65-4 may occur later.

Effects of MAP65-4 on MTs Dynamics in Vitro

In this study, we used TIRF microscopy to determine the dynamic parameters of individual MTs within MAP5-4-induced MT bundles. We found that MAP65-4 did not alter the intrinsic growth and shrinkage rates of MTs within bundles at both of their ends but that it reduced catastrophe and increased rescue frequencies in a dose-dependant manner. As MAP65-4 predom-

inantly localized along the MTs and not at their ends, and as the rate of (de)polymerization was not altered in the presence of MAP65-4, we speculate that the change in dynamics was the result of stabilization of the GTP/GDP lattice by cross-linking protofilaments of two adjacent MTs and/or two tubulin dimers on a protofilament. The net effect of a reduction in catastrophe events together with an increase in rescue events is that MAP65-4-bundled MTs elongate for a much longer period than single MTs. As a result, MT bundles are more stable than single MTs and progressively elongate, allowing them to potentially extend deep into the cellular space. MAP65-4-stimulated bundling serves as a brake when catastrophe events occur (see schematic drawing in Figure 7) and thus may prolong the half-life of

MTs during mitosis. A recent study on the midzone organization in yeast revealed that Ase1, the homolog of MAP65-1, is required for the reduction in dynamics of the interpolar MTs (Fridman et al., 2009). In plant cells, the dynamics of MTs that colocalized with MAP65-1 and MAP65-5 were analyzed in interphase cells. Previously, it was shown that MAP65-1- and MAP65-5-labeled MTs polymerized at a normal rate but that depolymerization was reduced twofold (Van Damme et al., 2004). Together, these results suggest that MAP65 proteins may regulate MT dynamic behavior by different mechanisms.

FRAP experiments showed that there was no recovery of MAP65-4 bound to MT bundles after 30 min, indicating that its dissociation parameter for MTs is very low. These data suggest that MAP65-4 behaves as tau, a neural MT bundler, which dissociates one molecule every 42 min in vitro (Ross et al., 2004). In vivo, the turnover rate of MAP65-4 might be much faster and could be similar to that of other members of the MAP65 family that have been reported to be in the range of 5 s for MAP65-1

(Chang et al., 2005; Smertenko et al., 2008) and 76 to 111 s for MAP65-3 (Smertenko et al., 2008). We have not attempted to study the MAP65-4 turnover in vivo because this protein does not associate with the interphase cortical arrays. Measuring fluorescence recovery of MAP65-4 within the mitotic spindle is not as reliable as measuring new fluorescent signals, which could correspond to new MT assembly within such a dense structure.

In our in vitro assays, the crossing over events between growing MT bundles were independent of the angle of encounter between two MT bundles. This is different to what has been documented for MT–MT interactions in the plant cortex during interphase, where mobile MTs and MT bundles coalign when the angle of incidence is $<40^\circ$, which allows for the formation of MT bundles in the cell cortex (Wasteneys and Ambrose, 2009). Because MAP65-4 is associated strictly with forming spindles during prophase and then with kinetochore fibers, it might, in contrast with MAP65-1, not participate in the MT–MT interactions that generate MT networks (Wasteneys and Ambrose, 2009). Furthermore, we hypothesize that the steric conformation of MT cross-bridges induced by MAP65-4 may not permit the considerable angles of MT bending required to bundle MTs with preexisting MTs, as described for MT bundles decorated with MAP65-1 within the cells (Wasteneys and Ambrose, 2009).

Spatiotemporal Correlation of MAP65-4 and Its Putative Role in Living Cells

Live-cell imaging of MAP65-4 distribution during the cell cycle of transformed tobacco BY-2 cells showed that its MT binding capacity was restricted to mitosis. At the transcriptional level, MAP65-4 is strongly upregulated at the beginning of mitosis (Van Damme et al., 2004). The presence of a consensus D box in MAP65-4 points to its possible 26S proteasome-dependent degradation during anaphase. Binding of GFP-MAP65-4 to MTs was also spatially regulated, and a selective binding was indeed noticed for centrally localized MTs at the prophase nucleus, while the cortical MTs and the PPB were not labeled by GFP-MAP65-4. During prophase, upon bipolarization of the perinuclear MT array, MAP65-4 started to accumulate at the two sides of the nucleus that corresponded to the future poles of the spindle, then with bundles that invaded the nuclear space at the NEB, and finally with the kinetochore fibers from prometaphase until late anaphase, suggesting that MAP65-4 has a role in the assembly of the acentrosomal bipolar mitotic spindle. The bipolarity of the spindle is initiated by the positioning of spindle poles outside the nuclear envelope where they may assemble (Lloyd and Chan, 2006; Vos et al., 2008). The proteins involved are not yet identified, but one can postulate that motor proteins and other MT binding proteins are instrumental in this process (Nédélec et al., 1997; Lloyd and Chan, 2006). MAP65-4 could be a partner involved in early spindle pole morphogenesis by stabilizing MT bundles focused to the poles. In addition, our observations suggest that MAP65-4 could be involved in the attachment of MTs to the paired kinetochores during prometaphase through the search-and-capture mechanism based on spatially biased MT dynamic instability, as described for centrosomal animal cells (Wollman et al., 2005). In this model, it is proposed that, during NEB, MT plus ends persistently grow

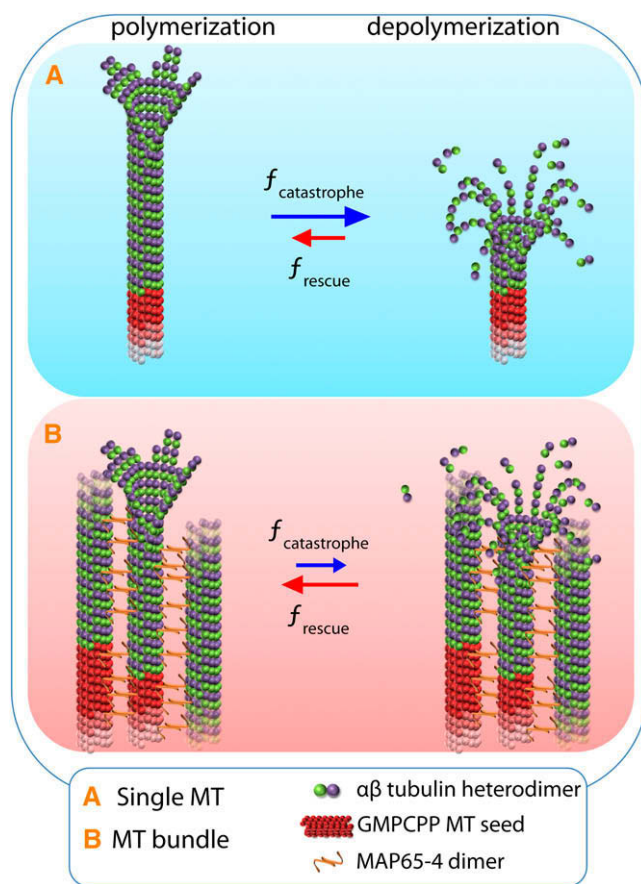


Figure 7. Schematic Summary of How MAP65-4 Facilitates Bundle Growth.

(A) Non cross-linked MTs display dynamic instability behaviors.

(B) Within bundles, we observed that MAP65-4 acts as a brake and increases the rescue frequencies. This induces an increase in MT elongation duration and thus builds long MT bundles.

toward chromosomes until they capture a kinetochore and that this establishes MT-based connections between chromosomes and spindle poles. To support MT persistent growth, catastrophe frequencies have to be depressed in the region between the poles and the chromosomes. Considering the localization of MAP65-4 and its effects on MT dynamic instability *in vitro*, it is tempting to postulate that MAP65-4 regulates the persistent assembly of MTs searching for kinetochores, presumably with other mechanisms, such as Ran-GTP gradients (Wollman et al., 2005). Besides the search and capture mechanism that underlies the formation of a kinetochore fiber, chromosome-based MT nucleation has been reported to be involved in the formation of acentrosomal and centrosomal spindles (Cleary and Hardham, 1988; Maiato et al., 2004; Chan et al., 2005). Indeed, in animal cells, TPX2 (the targeting protein for Xklp2) has been described to induce MT nucleation at the kinetochore through activation by active Ran GTPase and Aurora kinases (Gruss et al., 2002). Recently, the plant homolog of TPX2 was localized mainly with the two spindle halves from prometaphase to anaphase and may be involved in MT nucleation through its activation by an active Ran GTPase gradient (Vos et al., 2008). The local activation of MT nucleation by TPX2 followed by cross-linking through MAP65-4 activity could participate in the organization and stabilization of kinetochore fibers. Furthermore, MT nucleation via TPX2 activation may occur at the poles of the forming spindle before NEB, as there is a Ran-GTP gradient present there as well as an ortholog of Aurora kinase (Demidov et al., 2005). Thus, by cross-linking MTs and modulating their dynamics, MAP65-4 may stabilize the prospindle and promote bipolarity of the spindle by focusing the MT minus ends at the spindle poles. From these data, an emerging picture appears that strongly suggests that plants have a comparable mechanism to the centrosome-based animal mechanism, which involves spindle bipolarity formation before NEB, although this does not exclude the possibility that kinetochore fibers may nucleate MTs in early prometaphase.

In future work, it will be of great interest to determine the role of AtMAP65-4 in the assembly of plant acentrosomal mitotic spindles by identifying the molecular mechanisms that regulate its activity. The capacity of AtMAP65-4 to modulate MT dynamics within bundles makes it a promising candidate key regulator of spindle formation and organization.

METHODS

Recombinant Protein, Expression, and Purification

Arabidopsis thaliana MAP65-4 domains were purified as tagged proteins with a His tag at the N and C termini, mCherry, or GFP at the N terminus, or a His tag at the C terminus, using vectors as described by Gaillard et al. (2008). Primers used to amplify cDNAs are provided in Supplemental Table 1 online. Three domains were defined: (1) domain 1 (amino acids 1 to 135), domain 2 (amino acids 136 to 320), and domain 3 (amino acids 321 to 648). These domains and AtMAP65-4 deleted of one domain were further referred to as AtMAP65-4(1), AtMAP65-4(2), AtMAP65-4(3), AtMAP65-4(13) (lacks domain 2), and AtMAP65-4(23) (lacks domain 1). All sequences were verified by sequencing. Recombinant AtMAP65-4s proteins were purified on Ni Sepharose columns and stored at -80°C in 10% (v/v) glycerol, 50 mM NaPi, 0.1 M NaCl, and 0.5 mM DTT, pH 7.9, according to Gaillard et al. (2008).

Tubulin Polymerization and MT Binding Assays

Purified bovine tubulin (Vantard et al., 1994) was assembled in G-BRB80 buffer (BRB buffer: 80 mM PIPES, pH 6.8, 1 mM EGTA, and 1 mM MgCl_2 plus 1 mM GTP). Polymerization was monitored at 350 nm at 37°C . For MT binding assays, MTs were assembled from 20 mM unlabeled tubulin in the presence of 20 mM of taxotere (Sigma-Aldrich) in G-BRB80 at 37°C for 30 min and further diluted in MAP buffer (50 mM NaPi, 0.1 M NaCl, and 0.5 mM DTT, pH 7.9) supplemented with 10 mM taxotere. MTs were then incubated with AtMAP65-4s at 20°C for 20 min and sedimented at 100,000g for 10 min at 25°C . Supernatants and pellets were analyzed by SDS-PAGE and immunoblots and probed with anti-AtMAP65-4 antibodies. To analyze the relative efficiencies of the full length and constructs of AtMAP65-4 to bundle MTs, cosedimentation assays were performed at low speed centrifugation (10 min, 4000g, 25°C).

In Vitro Imaging Assays

Fluorescent tubulin (Alexa488-labeled tubulin and Alexa568-labeled tubulin) and biotinylated tubulin were prepared according to Hyman et al. (1991). For conventional fluorescence microscopy, fluorescent taxotere-stabilized MTs assembled from a mixture of fluorescent and unlabeled tubulin were incubated at 20°C in the absence or presence of AtMAP65s and sedimented on cover slips according to Gaillard et al. (2008). Samples were observed using a fluorescence microscope (Zeiss Axio-plan 2 microscope, $\times 63$ magnification, numerical aperture 1.3 objective, Hamamatsu CCD orcal camera, and Metaview image processing). For negative-stain electron microscopy observations, MTs (1 μM) were incubated at 20°C for 20 min with AtMAP65-4 (1 μM). Samples were stained with 2% (w/v) uranyl acetate and observed on a CM12 microscope (FEI Eindhoven) operating at 120 kV. MT dynamic behavior within AtMAP65-4-induced bundles was observed using TIRF microscopy. For the assays, stable MT seeds were obtained by two steps. First, 2.4 μM tubulin (1.9 μM Alexa-labeled tubulin and 0.5 μM biotin tubulin) was assembled in BRB80, 1 mM DTT, and 0.05 μM GMPCPP (Interchim) for 45 min at 37°C . Second, 0.24 μM of assembled MTs were extended by the addition of 2.7 μM tubulin (2.14 μM Alexa-labeled tubulin and 0.56 μM biotin tubulin) for 2 h at 37°C . Seed bundles were obtained by incubating 0.3 μM MT seeds with 0.1 μM AtMAP65-4 for 10 min at room temperature. To keep MT seeds within the excitation field, we used Neutravidin biotin binding protein (Pierce) specific to biotin to adhere MT seeds to the cover glass surface, which had been cleaned before with rounds of ethanol/water washes. MT seeds and MT seed bundles were then elongated by the addition of 22 μM tubulin (17 μM unlabeled tubulin and 5 μM Alexa-labeled tubulin), in the absence or the presence of AtMAP65-4 (range 0.1 to 0.5 μM), 1 mM GTP, an oxygen scavenger cocktail (2 mg/mL glucose, 80 μg /mL catalase, and 0.67 mg/mL glucose oxydase), and 1.5% BSA. Experiments were conducted in a final volume of 5 μL between glass silanized using dichloromethylsilane (Merck) to limit interactions between MTs and the cover glass (Figure 4A). MT dynamics were visualized at 32°C using an objective-based TIRF microscope (Nikon TE2000-E). Excitation was achieved using 491- and a 561-nm lasers to visualize GFP and Alexa488, and mCherry and Alexa568, respectively. Time-lapse microscopy (one frame every 2 s) was performed for 30 min using Metamorph software (version 6.3r7; Universal Imaging), and frames were analyzed using Metamorph; equalize light, basic filter, and flatten background were the filters used to improve the signal/noise ratio. MT bundle elongation and dynamics were analyzed using kymographs generated by Metamorph and analyzed with ImageJ. The statistical significance was determined using Student's *t* test. FRAP experiments were performed during time-lapse acquisition on small ($2 \times 2 \mu\text{m}$) or large ($5 \times 15 \mu\text{m}$) areas for 25 to 100 ms at 100% laser intensity. Fluorescence recovery was observed by measuring fluorescence intensity along line scans on the corresponding kymographs. Tubulin

fluorescence level served as an internal control. FRAP assays were performed on either GFP- or mCherry-AtMAP65-4, with the same results.

Transgenic Cells

Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Bright Yellow-2 (BY-2) cells were transformed as described by Geelen and Inzé (2001). Stably transformed BY-2 cells were immobilized in a chambered cover glass system (Lab-Tek) in a thin layer of BY-2 medium containing vitamins and 0.8% of low-melting-point agarose (Invitrogen). Cells were imaged on a Zeiss LSM710 inverted confocal microscope equipped with the ZEN software package using a C-Apochromat $\times 40/1.20$ W Korr M27 water-corrected lens. Excitation was performed with a multi argon laser (458, 488, and 514 nm) using 6% laser line attenuated transmission, a MBS488 dichroic mirror, and a spectral emission window ranging from 500 to 530 nm. Digital gain was set at 1.00, signal averaging was set at 8, and $\times 3$ digital zoom was applied. Time-lapse images were acquired using the multiposition time-lapse acquisition mode of the ZEN software, with a time interval of 4 min and an optical slice thickness of 1.57 airy units (1.34 μm).

Accession Number

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/EMBL databases under accession number At3g60840.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. Quantification of MAP65-4-GFP Fluorescence Signal within a Transformed Tobacco BY-2 Cell from G2 to Telophase.

Supplemental Figure 2. Colocalization of MAP65-4 with Microtubule Bundles, as Observed with Fluorescence Microscopy.

Supplemental Figure 3. Identification of the MT binding domain of MAP65-4.

Supplemental Figure 4. Collective Behavior of MTs within MAP65-4-Induced MT Bundles.

Supplemental Table 1. Primers Used to Amplify cDNAs Corresponding to Wild-Type and Truncated Forms of MAP65-4.

Supplemental Movie 1. Tobacco BY-2 Cells Expressing MAP65-4-GFP 4, from G2 to Telophase.

Supplemental Movie 2. Tobacco BY-2 Cells Expressing MAP65-4-GFP 4, from G2 to Telophase.

Supplemental Movie 3. Dynamic Instability Behavior of a Single MT Observed Using TIRF Microscopy.

Supplemental Movie 4. Dynamics of MT Bundles Induced by MAP65-4 Observed Using TIRF Microscopy.

Supplemental Movie 5. Encounters of MAP65-4-Induced MT Bundles Observed Using TIRF Microscopy.

Supplemental Movie Legends.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank "Physics of the Cytoskeleton and Morphogenesis" team members for helpful discussions and insightful suggestions. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique and Commissariat à l'Energie Atomique research programs and from French

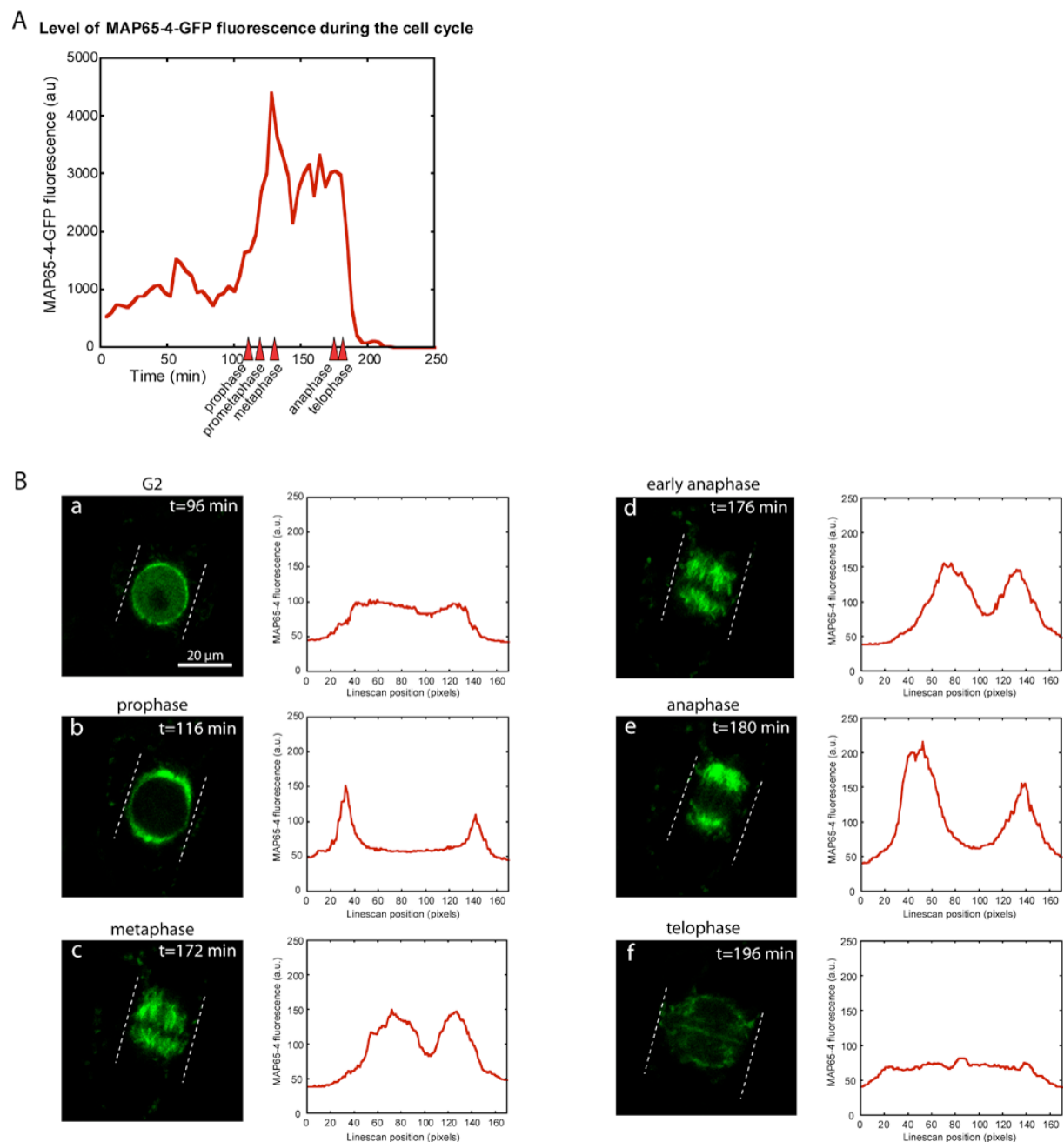
research ministry support to V.F. D.V.D. is a postdoctoral fellow of the Research Foundation of Flanders.

Received October 19, 2010; revised October 27, 2010; accepted November 10, 2010; published November 30, 2010.

REFERENCES

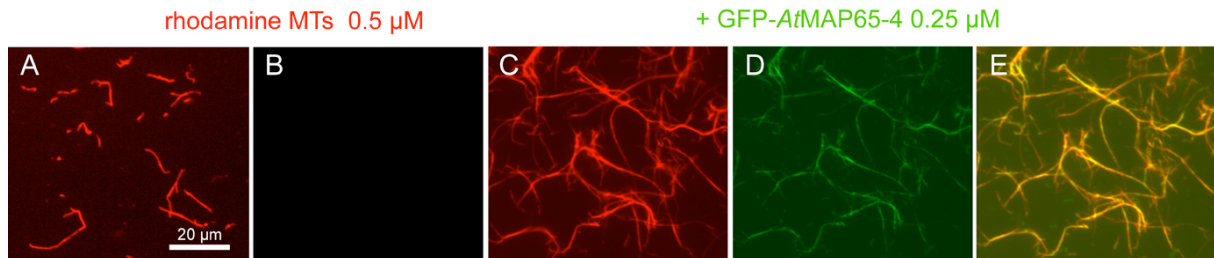
- Ambrose, J.C., Li, W., Marcus, A., Ma, H., and Cyr, R. (2005). A minus-end-directed kinesin with plus-end tracking protein activity is involved in spindle morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* **16**: 1584–1592.
- Ambrose, J.C., and Cyr, R. (2007). The kinesin ATK5 functions in early spindle assembly in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 226–236.
- Bratman, S.V., and Chang, F. (2007). Stabilization of overlapping microtubules by fission yeast CLASP. *Dev. Cell* **13**: 812–827.
- Caillaud, M.C., Lecomte, P., Jammes, F., Quentin, M., Pagnotta, S., Andrio, E., de Almeida Engler, J., Marfaing, N., Gounon, P., Abad, P., and Favery, B. (2008). MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 423–437.
- Chan, J., Calder, G., Fox, S., and Lloyd, C. (2005). Localization of the microtubule end binding protein EB1 reveals alternative pathways of spindle development in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Cell* **17**: 1737–1748.
- Chan, J., Jensen, C.G., Jensen, L.C., Bush, M., and Lloyd, C.W. (1999). The 65-kDa carrot microtubule-associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14931–14936.
- Chan, J., Sambade, A., Calder, G., and Lloyd, C. (2009). *Arabidopsis* cortical microtubules are initiated along, as well as branching from, existing microtubules. *Plant Cell* **21**: 2298–2306.
- Chang, H.Y., Smertenko, A.P., Igarashi, H., Dixon, D.P., and Hussey, P.J. (2005). Dynamic interaction of NtMAP65-1a with microtubules in vivo. *J. Cell Sci.* **118**: 3195–3201.
- Chen, R.H. (2002). BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. *J. Cell Biol.* **158**: 487–496.
- Cleary, A.L., and Hardham, A.R. (1988). Depolymerization of microtubule arrays in root tip cells by oryzalin and their recovery with modified nucleation patterns. *Can. J. Bot.* **66**: 2353–2366.
- Demidov, D., Van Damme, D., Geelen, D., Blattner, F.R., and Houben, A. (2005). Identification and dynamics of two classes of aurora-like kinases in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Cell* **17**: 836–848.
- Dixit, R., and Cyr, R. (2004). Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modifications of microtubule behavior. *Plant Cell* **16**: 3274–3284.
- Ehrhardt, D.W. (2008). Straighten up and fly right: microtubule dynamics and organization of non-centrosomal arrays in higher plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**: 107–116.
- Fridman, V., Gerson-Gurwitz, A., Movshovich, N., Kupiec, M., and Gheber, L. (2009). Midzone organization restricts inter-polar microtubule plus-end dynamics during spindle elongation. *EMBO Rep.* **10**: 387–393.
- Gaillard, J., Neumann, E., Van Damme, D., Stoppin-Mellet, V., Ebel, C., Barbier, E., Geelen, D., and Vantard, M. (2008). Two microtubule-associated proteins of *Arabidopsis* MAP65s promote antiparallel microtubule bundling. *Mol. Biol. Cell* **19**: 4534–4544.
- Geelen, D.N., and Inzé, D.G. (2001). A bright future for the bright yellow-2 cell culture. *Plant Physiol.* **127**: 1375–1379.

- Gruss, O.J., Wittmann, M., Yokoyama, H., Pepperkok, R., Kufer, T., Silljé, H., Karsenti, E., Mattaj, I.W., and Vernos, I. (2002). Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nat. Cell Biol.* **4**: 871–879.
- Hussey, P.J., Hawkins, T.J., Igarashi, H., Kaloriti, D., and Smertenko, A. (2002). The plant cytoskeleton: Recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol. Biol.* **50**: 915–924.
- Hyman, A., Drechsel, D., Kellogg, D., Salser, S., Sawin, K., Steffen, P., Wordeman, L., and Mitchison, T. (1991). Preparation of modified tubulins. *Methods Enzymol.* **196**: 478–485.
- Janson, M.E., Loughlin, R., Loïdice, I., Fu, C., Brunner, D., Nédélec, F.J., and Tran, P.T. (2007). Crosslinkers and motors organize dynamic microtubules to form stable bipolar arrays in fission yeast. *Cell* **128**: 357–368.
- Li, H., Zeng, X., Liu, Z.Q., Meng, Q.T., Yuan, M., and Mao, T.L. (2009). *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-2 acts as a microtubule stabilizer. *Plant Mol. Biol.* **69**: 313–324.
- Lloyd, C., and Chan, J. (2006). Not so divided: The common basis of plant and animal cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 147–152.
- Maiato, H., Rieder, C.L., and Khodjakov, A. (2004). Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J. Cell Biol.* **167**: 831–840.
- Mao, G., Chan, J., Calder, G., Doonan, J.H., and Lloyd, C.W. (2005). Modulated targeting of GFP-AtMAP65-1 to central spindle microtubules during division. *Plant J.* **43**: 469–478.
- McDonald, K.L., O'Toole, E.T., Mastronarde, D.N., and McIntosh, J.R. (1992). Kinetochore microtubules in PTK cells. *J. Cell Biol.* **118**: 369–383.
- Mollinari, C., Kleman, J.P., Jiang, W., Schoehn, G., Hunter, T., and Margolis, R.L. (2002). PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J. Cell Biol.* **157**: 1175–1186.
- Müller, S., Smertenko, A., Wagner, V., Heinrich, M., Hussey, P.J., and Hauser, M.T. (2004). The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Curr. Biol.* **14**: 412–417.
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T.I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T., and Hasebe, M. (2005). Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nat. Cell Biol.* **7**: 961–968.
- Nédélec, F.J., Surrey, T., Maggs, A.C., and Leibler, S. (1997). Self-organization of microtubules and motors. *Nature* **389**: 305–308.
- Ross, J.L., Santangelo, C.D., Makrides, V., and Fygenon, D.K. (2004). Tau induces cooperative Taxol binding to microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 12910–12915.
- Shaw, S.L., Kamyar, R., and Ehrhardt, D.W. (2003). Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science* **300**: 1715–1718.
- Smertenko, A.P., Chang, H.Y., Wagner, V., Kaloriti, D., Fenyk, S., Sonobe, S., Lloyd, C.W., Hauser, M.T., and Hussey, P.J. (2004). The *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-1: Molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell* **16**: 2035–2047.
- Smertenko, A.P., Kaloriti, D., Chang, H.Y., Fiserova, J., Opatrný, Z., and Hussey, P.J. (2008). The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of *Arabidopsis* microtubule-associated protein MAP65 isoforms. *Plant Cell* **20**: 3346–3358.
- Smirnova, E.A., Reddy, A.S., Bowser, J., and Bajer, A.S. (1998). Minus end-directed kinesin-like motor protein, Kcbp, localizes to anaphase spindle poles in *Haemanthus* endosperm. *Cell Motil. Cytoskeleton* **41**: 271–280.
- Stoppin-Mellet, V., Gaillard, J., and Vantard, M. (2006). Katanin's severing activity favors bundling of cortical microtubules in plants. *Plant J.* **46**: 1009–1017.
- Subramanian, R., Wilson-Kubalek, E.M., Arthur, C.P., Bick, M.J., Campbell, E.A., Darst, S.A., Milligan, R.A., and Kapoor, T.M. (2010). Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein. *Cell* **142**: 433–443.
- Van Damme, D., Van Poucke, K., Boutant, E., Ritzenthaler, C., Inzé, D., and Geelen, D. (2004). *In vivo* dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol.* **136**: 3956–3967.
- Vantard, M., Peter, C., Fellous, A., Schellenbaum, P., and Lambert, A.M. (1994). Characterization of a 100-kDa heat-stable microtubule-associated protein from higher plants. *Eur. J. Biochem.* **220**: 847–853.
- Vos, J.W., Pieuchot, L., Evrard, J.L., Janski, N., Bergdoll, M., de Ronde, D., Perez, L.H., Sardon, T., Vernos, I., and Schmit, A.C. (2008). The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. *Plant Cell* **20**: 2783–2797.
- Wasteneys, G.O., and Ambrose, J.C. (2009). Spatial organization of plant cortical microtubules: Close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol.* **19**: 62–71.
- Wollman, R., Cytrynbaum, E.N., Jones, J.T., Meyer, T., Scholey, J.M., and Mogilner, A. (2005). Efficient chromosome capture requires a bias in the 'search-and-capture' process during mitotic spindle assembly. *Curr. Biol.* **15**: 828–832.

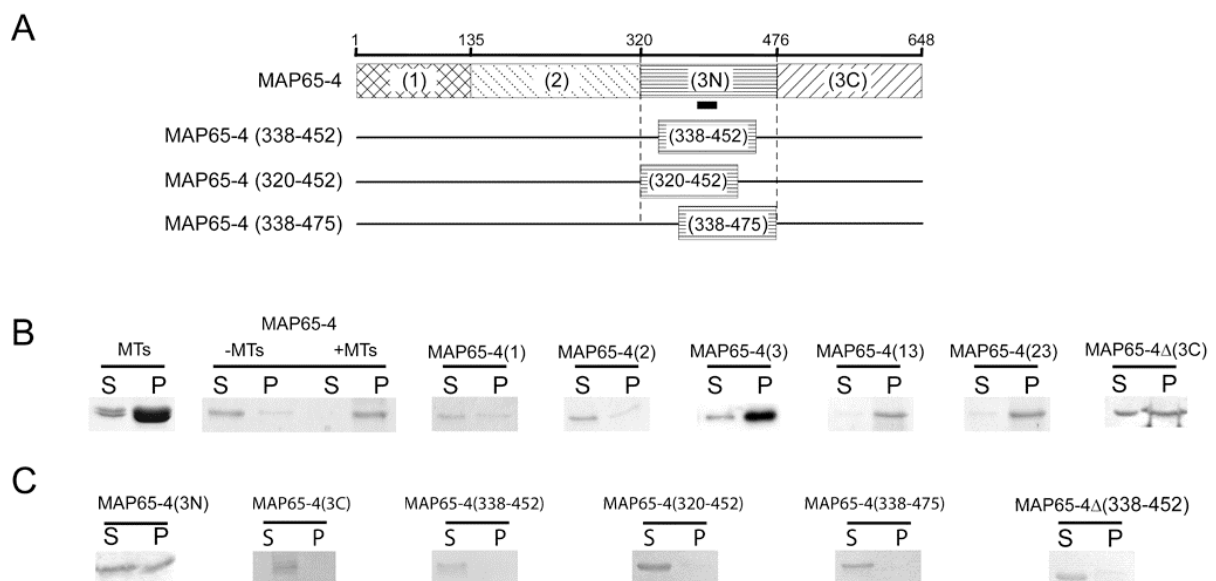


Supplemental Figure 1. Quantification of MAP65-4-GFP fluorescence signal within a transformed tobacco BY-2 cell from G2 to telophase. **A.** Fluorescence signal of MAP65-4-GFP within a transformed cell from G2 to telophase corresponding to the cell shown in Supplemental Movie 1 online. **B.** MAP65-4-GFP fluorescence levels at different stages of mitosis within the cell shown in Supplemental Movie 1 online. The linescans were performed

between the dotted lines from the top to the bottom of the cell and the fluorescence distributions are represented on the associated graphs.

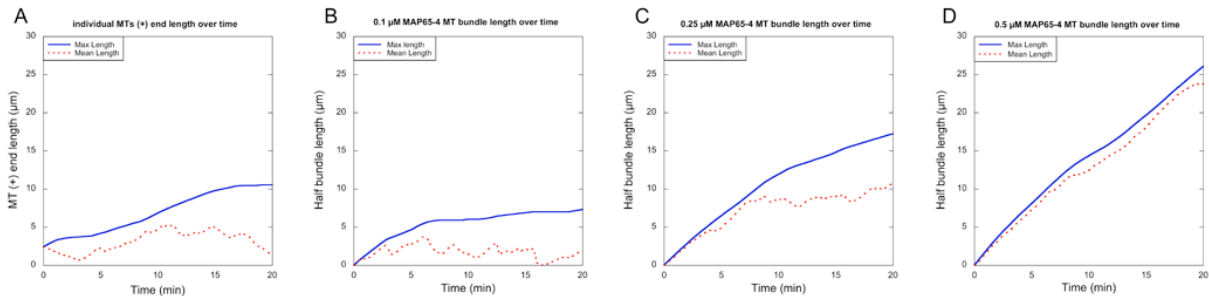


Supplemental Figure 2. Colocalization of MAP65-4 with microtubule bundles, as observed with fluorescence microscopy. Rhodamine-labelled taxotere-stabilized MTs (0.5 μ M) were incubated in the absence (A, B) or presence (C, D, E) of 0.25 μ M GFP-MAP65-4 for 20 min at room temperature. MTs were observed in the rhodamine (A, C) and GFP (B, D) channels, and merged images of (C) and (D) are presented in (E).



Supplemental Figure 3. Identification of the MT-binding domain of MAP65-4. A. Diagrams of the MAP65-4(3N) truncations. B. High-speed co-sedimentation after incubation of 1 μ M MAP65-4 with 5 μ M MTs *in vitro*. Pellets (P) and supernatant (S) were analyzed by SDS-PAGE. MAP65-4(3), which has a molecular weight comparable to that of tubulin, was

detected by immunoblot using antibodies directed against MAP65-4. One MT-binding domain was identified, and corresponds to the 3N domain.

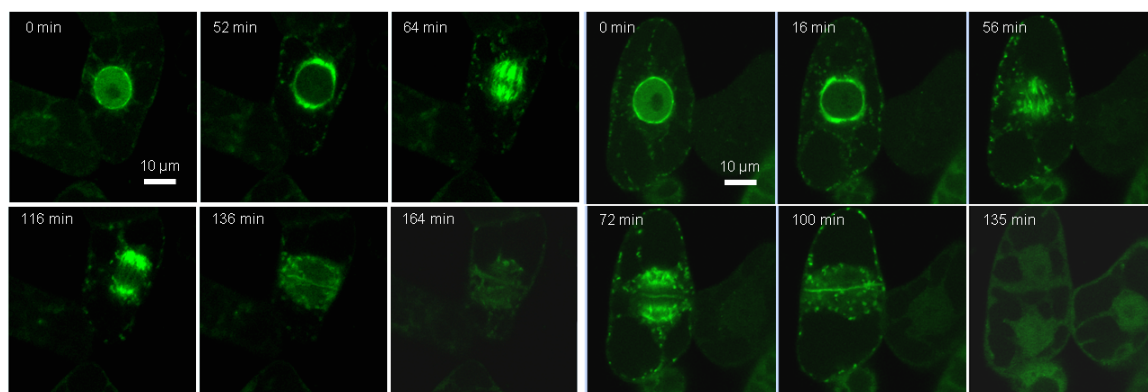


Supplemental Figure 4. Collective behavior of MTs within MAP65-4-induced MT bundles. Plots of the mean and maximal elongation of individual MTs (A) or of MTs within bundles induced by various concentrations of MAP65-4 (B-C-D). Lengths were plotted over time and were measured on kymographs using single MT seeds as references. The distance between mean and maxima MT lengths decreased with increasing MAP65-4 concentrations. At a bundle scale, up to 0.25 μ M MAP65-4 bundles appear to grow indefinitely.

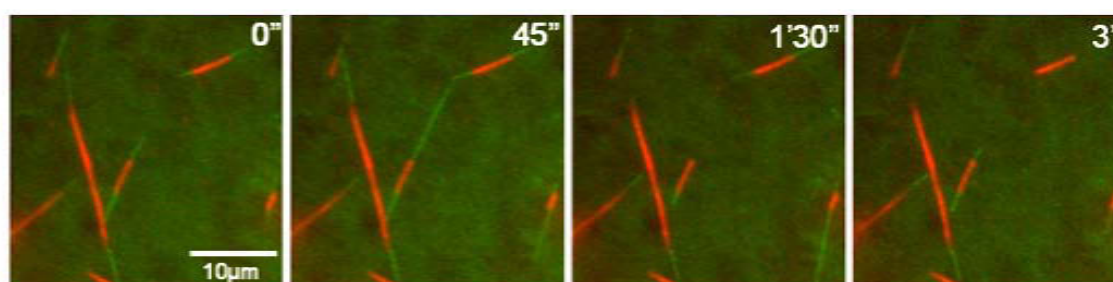
Supplemental Table 1. Primers used to amplify cDNAs corresponding to wild-type and truncated forms of MAP65-4.

MAP65-4 primers	sequence
For MAP65-4	CACCATGGGAGAGACTGAGGATGAAAAAGA
Rev MAP65-4 (1)	TCGCTTCAGAGGTTGGAGGAATTGCGT
For MAP65-4 (2)	AGCCAGTTGGGTGAGCTCCA
Rev MAP65-4 (2)	ACTTTTCAGTTGAAGCTATAGAATCTGGT
For MAP65-4 (3)	GTCAAGGATCCTGAGCAGTTGT
Rev MAP65-4 (3N)	TCTAAACCAAGCCCAAATAAAAGC
For MAP65-4 (3C)	CACCGGAAAGAAACCACTGAGAACACCA
Rev MAP65-4	GAGGTTAGGGCCGGTTTTTGC

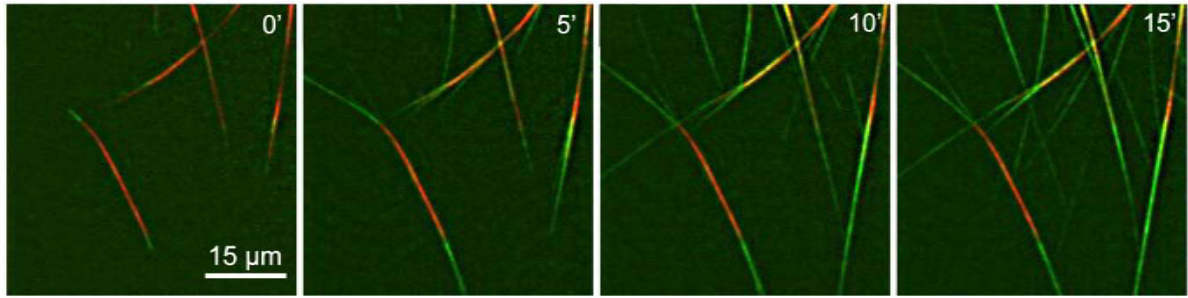
Supplemental Movies



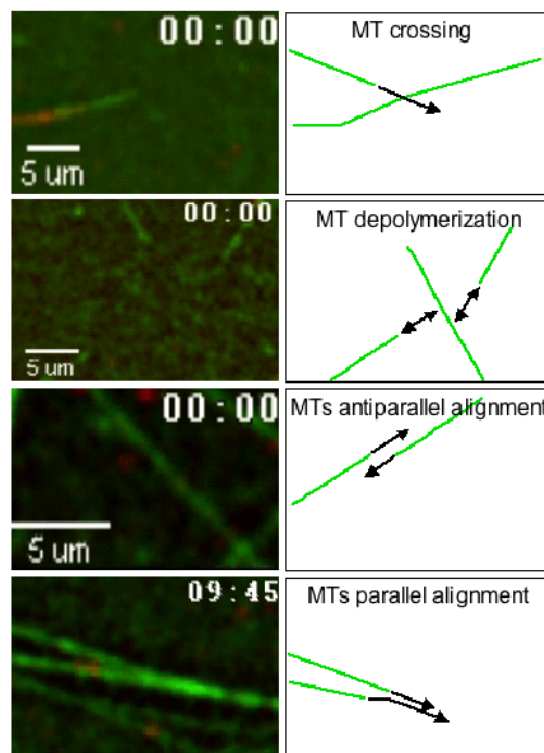
Supplemental movies 1&2: Tobacco BY-2 cells expressing *AtMAP65-4-GFP 4* undergoing from G2 to telophase. Movie1 is from experiment shown in Figure 1b, e and Movie2 is from experiment shown in Figure 1c and Supplemental Figure 1. Frames were collected every 4 min and the video is shown at 0.5 sec/frames.



Supplemental movie 3: Dynamic instability behavior of a single MT observed using TIRFm. Dual view time lapse series of a MT: seed (red, 0.3 μ M) was elongated by the addition of Alexa⁴⁸⁸-labelled tubulin (green, 22 μ M). This movie is from experiment shown in Figure 5B1. Frames were collected every 5 s and the video is shown at 12.5 frames /s.



Supplemental movie 4: Dynamic of MT bundles induced by *AtMAP65-4* observed using TIRFm. Dual view time lapse series of a MT: seed bundles (0.3 μM) were grown from the addition of Alexa⁴⁸⁸-labelled tubulin (22 μM) incubated with *AtMAP65-4* (0.25 μM). This movie is from experiment shown in Figure 5B2. Frames were collected every 5 s and the video is shown at 6 frames /s.



Supplemental movie 5: MTs encounters observed using TIRFm in the presence of *AtMAP65-4*. Dual view time lapse series of a MT: seed bundles (0.3 μM) were grown from the addition of Alexa⁴⁸⁸-labelled tubulin (22 μM) incubated with *AtMAP65-4* (0.25 μM). When 2 MTs meet, we observed that in: 88% of cases MTs crossed, 7% of cases MT depolymerized after MT contact, 4% of cases MT pauses after a MT contact and in 1% of cases MTs coalign.

4. Conclusion et perspectives

Au cours de cette étude, nous avons montré qu'*in vitro*, AtMAP65-4 a la propriété d'induire des faisceaux de MTs sans polarité déterminée. Au sein des faisceaux, les MTs sont organisés parallèlement les uns aux autres, espacés de 15 nm et la MAP est perpendiculairement orientée par rapport à l'axe des MTs avec un angle de 90°. A titre de comparaison, AtMAP65-1 et -5 induisent également des faisceaux de MTs *in vitro*. Dans ce cas, au sein des faisceaux, les MTs sont organisés parallèlement les uns aux autres avec des polarité opposées, sont espacés de 30-40 nm et les MAPs sont diagonalement orientées par rapport à l'axe des MTs avec un angle de 60° (Gaillard *et al.*, 2008). Ces données montrent que : bien que les domaines en amont du domaine de liaison aux MTs soient de longueurs comparables entre ces différentes AtMAP65s, et qu'il existe des homologies de séquences dans le domaine de liaison aux MTs, la conformation tridimensionnelle d'AtMAP65-4 permet l'interaction avec des MTs de même polarité ou de polarité opposée ce qui la différencie d'AtMAP65-1 et -5 et de PRC1. En effet, dans le cas de cette MAP65, les travaux réalisés *in vitro* par Bieling *et al.*, (2010) démontrent qu'elle possède une affinité 28 fois supérieure pour la liaison avec des MTs antiparallèles. Cette liaison spécifique est responsable de la mise en place et du maintien des MTs interdigités lors de l'anaphase dans des cellules de mammifères. Une étude comparable à l'échelle de la molécule unique est envisageable pour AtMAP65-4 afin d'étudier son mécanisme de liaison le long des MTs. *In vivo*, AtMAP65-4 se lie préférentiellement à des MTs de même polarité tels que les MTs des pôles fusoriaux et les MTs des fibres kinétochoriennes dont l'extrémité (-) est localisée vers les pôles. En l'état des connaissances, nous pouvons spéculer que l'orientation des MTs avec lesquels AtMAP65-4 se lie est définie par des protéines/mécanismes moléculaires tels que la localisation des sites de nucléation des MTs. De plus, la régulation de la liaison d'AtMAP65-4 au cours de la mitose reste encore inconnue.

L'analyse des domaines fonctionnels d'AtMAP65-4 montre que cette MAP ne possède qu'un seul domaine de liaison aux MTs localisé dans la partie conservée au cours de l'évolution entre les MAP65s (domaine N-terminal de l'ensemble du domaine C-terminal de la protéine), les domaines N-terminaux et centraux étant impliqués dans la formation de faisceaux de MTs ainsi que le domaine de liaison aux MTs. L'ensemble des données obtenues (espacement entre les MTs au sein des faisceaux trop long pour être couvert par une seule protéine, un seul domaine de liaison aux microtubules par MAP, pas d'accumulation le long de MTs

individuels) suggèrent que les ponts inter-microtubulaires observés au sein des faisceaux correspondent au minimum à des homodimères d'*AtMAP65-4*. Ces données nous conduisent à émettre l'hypothèse selon laquelle, pour induire la formation de faisceaux, *AtMAP65-4* se lie aux MTs de façon non stable, et c'est la formation de l'homodimère *AtMAP65-4* entre MTs adjacents qui stabilise cette liaison. Des données obtenues pour les *AtMAP65-1* et -5 et qui montrent notamment que ces protéines sont monomériques en solution et ne se lient pas de façon stable à des MTs individuels, avait conduit à émettre une telle hypothèse (Gaillard *et al.*, 2008 ; Stoppin-Mellet *et al.*, article Cf Chapitre III). Très récemment, les travaux de Subramanian *et al.*, (2010) montrent que PRC1, contrairement à son homologue *AtMAP65-1* se lie aux MTs sous forme d'un homodimère. Sa liaison avec un MT adjacent de polarité opposée entraîne un changement de conformation de domaines non structurés présents dans la protéine, stabilisant ainsi sa liaison avec deux MTs. Cette conformation favorable serait à l'origine de la préférence de la MAP pour la liaison de MTs antiparallèles. Le domaine de liaison aux MTs d'*AtMAP65-4* étant impliqué dans la formation des faisceaux de MTs, ce qui n'est pas le cas d'*AtMAP65-1*, et *AtMAP65-4* ne présentant pas de préférence quand à sa liaison avec des MTs orientés selon une polarité définie *in vitro*, nous formulons l'hypothèse selon laquelle la conformation de son domaine de liaison aux MTs doit être différente de celle des autres MAP65s décrites à ce jour. L'état d'oligomérisation d'*AtMAP65-4* en solution n'a pas été déterminé.

Jusqu'ici la dynamique de MTs individuels a été étudiée par différentes approches qui ont permis d'identifier deux comportements dynamiques intrinsèques des MTs (« treadmilling » et « instabilité dynamique ») tant *in vitro* qu'*in vivo* ainsi que leur modulation par des MAPs. Par contre, l'analyse de la dynamique des MTs dans des structures complexes comme les faisceaux de MTs est moins documentée bien que des faisceaux soient observés dans la majorité des réseaux de MTs de nombreuses cellules acentrosomales (cellules de plantes, certaines cellules animales différenciées). Enfin, la dynamique des MAPs au cours de la formation de faisceaux de MTs et le suivi de leurs interactions moléculaires avec les MTs restaient aussi très peu étudiés lorsque j'ai débuté ma thèse. L'une des raisons majeures était la difficulté technique qu'il y a à observer de tels mécanismes en temps réel et à l'échelle de la molécule unique. Aussi, pour disséquer à l'échelle moléculaire la formation de faisceaux et le comportement dynamique des MTs au sein des faisceaux induits par les *AtMAP65s*, j'ai mis au point, en collaboration avec Virginie Stoppin-Mellet, un système biomimétique qui permet la polymérisation de MTs *in vitro* dans des conditions contrôlées et son observation en temps réel, par utilisation de la microscopie à onde évanescente (« Total Internal Reflexion

Fluorescent Microscopy », TIRFM). En présence de concentrations variées d'*AtMAP65-4*, ce type d'analyse nous a permis de démontrer qu'*in vitro*, *AtMAP65-4* n'affecte pas les vitesses d'élongation et de dépolymérisation des MTs à leurs deux extrémités, mais diminue fortement la fréquence des événements de catastrophe aux deux extrémités et augmente la fréquence des événements de sauvetage essentiellement à l'extrémité (+). De plus, *AtMAP65-4* augmente la durée des phases d'élongation des MTs et réduit la durée des phases de raccourcissement à leurs deux extrémités. L'ensemble des données montre qu'*AtMAP65-4* diminue significativement le comportement d'instabilité dynamique des MTs, ce qui a pour conséquence un allongement progressif des faisceaux de MTs. Pour expliquer ces observations, nous émettons l'hypothèse que la MAP agisse comme un frein lors des phases de dépolymérisation, ou comme une agrafe qui empêcherait d'ouvrir une fermeture éclair. Pour mieux comprendre la formation des faisceaux de MTs et aussi accéder à des données que les expériences ne peuvent nous permettre d'obtenir, une modélisation de la dynamique d'assemblage des faisceaux de MTs et du rôle d'*AtMAP65-4* dans la modulation du comportement dynamique des MTs a été réalisée en collaboration avec Jean-Louis Martiel et Virginie Stoppin-Mellet (cf Chapitre III).

Si l'on replace les données obtenues jusqu'ici dans le contexte de la cellule, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle le « zippering » par *AtMAP65-4* de MTs en prophase contribue à maintenir la bipolarité du fuseau mitotique lors de sa mise en place en focalisant les extrémités (-) des MTs vers les pôles. *AtMAP65-4* pourrait donc être un partenaire moléculaire impliqué dans les mécanismes de morphogenèse du fuseau mitotique en stabilisant les faisceaux de MTs focalisés vers les pôles. Il est à rappeler que dans les cellules de plantes, les pôles sont dépourvus de centrosomes. De plus, nos observations suggèrent qu'*AtMAP65-4* pourrait être impliquée dans l'attachement des MTs aux kinétochores des chromosomes au cours de la prométaphase par le mécanisme de « biased search and capture » décrit pour les cellules animales possédant un centrosome (Wolmann *et al.*, 2005). Ainsi, l'ensemble des données obtenues suggèrent fortement que les cellules de plantes organisent la bipolarité du fuseau mitotique avant la rupture de l'enveloppe nucléaire de manière comparable à celle des cellules possédant un centrosome. Ce mécanisme n'exclut pas que des MTs participant à la formation des fibres kinétochoriennes puissent être nucléées en début de prométaphase (Chan *et al.*, 2005).

Il sera particulièrement intéressant de déterminer le rôle d'*AtMAP65-4* dans l'assemblage des fuseaux mitotiques acentrosomaux de plantes, en identifiant les mécanismes moléculaires qui régulent son activité. La localisation d'*AtMAP65-4* en mitose et la

modulation du comportement dynamique des MTs lorsqu'ils sont organisés en faisceaux par cette MAP désigne *AtMAP65-4* comme un bon candidat pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation et l'organisation des fuseaux acentrosomaux.

Une approche pour mieux appréhender son rôle en mitose est d'analyser l'organisation du fuseau et le déroulement de la mitose dans des mutants d'*Arabidopsis*. Pour cette étude, nous avons obtenus des mutants d'*Arabidopsis* d'*Atmap65-4* qui n'expriment pas la MAP. Ce sont des plantes qui présentent un transgène inséré de façon homozygote dans le gène d'*AtMAP65-4* et qui bloque son expression. Les plantes mutantes *Atmap65-4*, ou KO *AtMAP65-4*, ont été sélectionnées par Bruno Favery (Nice-Sophia Antipolis) suivant le protocole décrit dans le Chapitre Matériels et Méthodes § 5.2. Afin de visualiser les réseaux de MTs dans les plantes KO *AtMAP65-4*, nous les avons croisées avec des plantes qui expriment de la tubuline fusionnée à la GFP (TUA-GFP). La lignée obtenue a ensuite été croisée avec elle-même afin de sélectionner les plantes KO homozygotes pour *AtMAP65-4* et exprimant de la tubuline-GFP. L'analyse des plantes *Atmap65-4* ne nous a pas permis d'observer un phénotype les discriminant des plantes sauvages pour l'ensemble des étapes du développement d'*Arabidopsis*. Au niveau cellulaire, nous avons comparé l'organisation des réseaux de MTs entre plantes n'exprimant pas *AtMAP65-4* et exprimant TUA-GFP et des plantes contrôles TUA-GFP. Les observations effectuées jusqu'ici en microscopie confocale ne nous ont pas permis de détecter des différences significatives dans l'organisation des fuseaux mitotiques entre plantes sauvages et mutées. Cependant, le suivi de la mitose au cours du temps n'a pas encore été étudiée et plus généralement les analyses réalisées jusqu'ici demandent à être approfondies. En conclusion, ces premières données peuvent suggérer qu'un autre membre de la famille des *AtMAP65s* pourrait compenser l'absence d'*AtMAP65-4* et que des redondances d'activité entre certains membres de la famille des *AtMAP65s* puissent exister et ou que d'autres protéines puissent assurer un rôle comparable étant donné son importance pour la cellule.

L'étude de l'absence d'*AtMAP65-4* par des approches de RNAi dans des cellules de tabac BY-2 en culture ne peut être envisagée actuellement, le gène codant pour l'homologue d'*AtMAP65-4* chez le tabac n'ayant pas encore été identifié.

CHAPITRE II

Etude de la phosphorylation d'*At*MAP65-4 par les kinases Auroras

1. Introduction

Nous avons montré au cours de notre étude qu'*At*MAP65-4 est strictement localisée avec certaines populations de MTs en mitose, même lorsqu'elle est surexprimée sous la dépendance d'un promoteur fort. Ces données suggèrent que la liaison d'*At*MAP65-4 aux MTs est très contrôlée dans le temps et dans l'espace. Pour comprendre les mécanismes de régulation de la liaison d'*At*MAP65-4 aux MTs au cours de la mitose et de son activité, j'ai débuté une étude visant à rechercher les processus moléculaires impliqués. Jusqu'ici, les connaissances acquises sur le mode de régulation de la localisation et de l'activité de MAP65s restent faibles mais cependant elles concernent toutes des mécanismes de phosphorylation. Ainsi, chez les mammifères, PRC1 est phosphorylée par la cycline CDK (Mollinari *et al.*, 2002), l'expression d'un mutant non phosphorylable dans des cellules en culture entraînant un arrêt de la mitose qui est lié à la formation de très nombreux faisceaux de MTs en métaphase. De plus, une étude plus récente a montré que la phosphorylation de PRC1 par CDK est à l'origine de sa localisation dans la zone des MTs interdigités au centre du fuseau mitotique en anaphase par la kinésine KIF4 (Zhu and Jiang, 2005). Des travaux menés sur *Saccharomyces cerevisiae* établissent un mécanisme de régulation de l'activité d'une kinésine, Cin8, par l'état de phosphorylation de Ase1p (Khmelninskii *et al.*, 2009). Ainsi, Ase1p phosphorylée et liée aux MTs de manière statique influencerait l'activité et la localisation de Cin8 impliquée dans le glissement des MTs interpolaires en mitose. Cette phosphorylation par la kinase CDK1 serait le signal cellulaire à l'origine de la coordination entre l'élongation du fuseau mitotique avec la transition métaphase – anaphase (Khmelninskii *et al.*, 2009).

En ce qui concerne les *At*MAP65s, deux études ont montré qu'*At*MAP65-1 est potentiellement phosphorylée par une cycline CDK1 (Smertenko *et al.*, 2006) et est

phosphorylée *in vitro* par une MAPK (Sanabe *et al.*, 2006). Ces phosphorylations inhibent partiellement sa liaison avec les MTs tant *in vitro* qu'*in vivo*. Smertenko *et al.*, (2006) ont émis l'hypothèse selon laquelle la liaison de la MAP avec les MTs reposant sur des interactions électrostatiques et les MTs étant chargés négativement, l'apport de charges négatives sur la MAP pourrait provoquer un affaiblissement de cette liaison et entraîner le détachement de la MAP des MTs.

L'ensemble de ces données nous a conduit à rechercher si *AtMAP65-4* pouvait être phosphorylée et si cette modification pouvait modifier son activité. Parmi les nombreuses kinases pouvant potentiellement phosphoryler *AtMAP65-4*, nous avons choisi d'étudier les Auroras kinases décrites pour jouer un rôle crucial dans la régulation de la division des cellules animales et des levures (Carmena and Earnshaw, 2003). Les Auroras sont des sérines - thréonines kinases conservées au cours de l'évolution, dont un seul gène est présent chez la levure et trois chez les humains. Les Auroras A, B, et C humaines sont classées par rapport à leur localisation cellulaire. Aurora A est essentielle pour la séparation des centrosomes et joue un rôle majeur dans la mise en place du fuseau mitotique ; les Auroras B et C présentent des localisations différentes selon les étapes du cycle cellulaire et leurs fonctions au cours de la mitose sont complexes. Trois homologues des Aurora humaines ont été identifiés chez *Arabidopsis* (Demidov *et al.*, 2005). *AtAurora 1* et *AtAurora 2* sont localisées dans le fuseau mitotique, ainsi qu'avec les structures typiques des cellules de plante telles que l'anneau préprophasique et la plaque cellulaire en télophase (Figure 13). *AtAurora 3* est localisée aux kinétochores lors des transitions métaphase - anaphase (Demidov *et al.*, 2005). Les substrats des *AtAuroras 1, 2* et *3* restent jusqu'ici non connus.

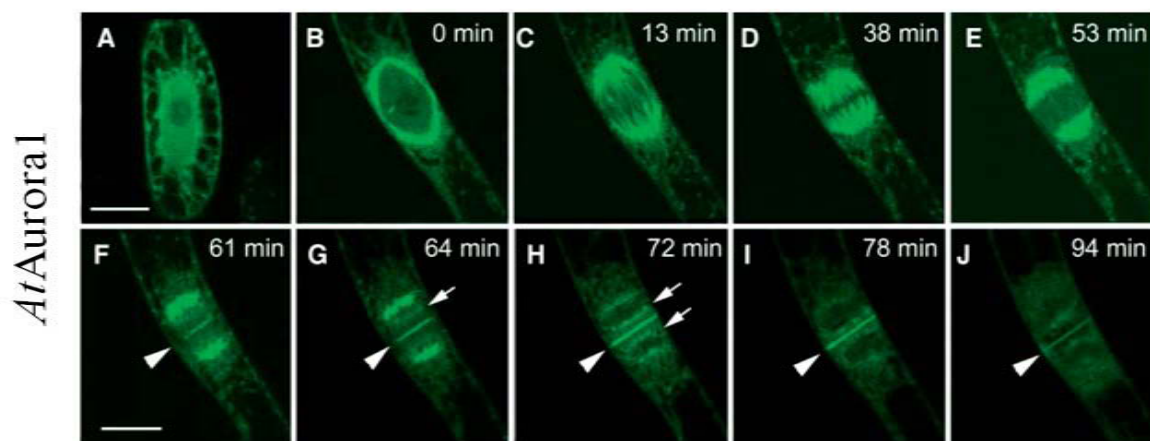


Figure 13: Localisation subcellulaire de GFP-*AtAurora1* dans des cellules de tabac BY-2.

AtAurora1 est présente dans le cytoplasme et le noyau pendant l'interphase (A). Dès l'entrée dans la division cellulaire, *AtAurora1* se concentre dans la région périnucléaire (B). En métaphase, *AtAurora1* est associée avec les MTs du fuseau mitotique (C) puis elle migre vers les pôles (D-F) en anaphase. Le marquage aux pôles disparaît progressivement alors qu'en fin de mitose *AtAurora1* est présente à la plaque cellulaire. Barre d'échelle : 20 μ m. (Demidov *et al.*, 2005)

La coïncidence de la localisation entre *AtAurora 1* et 2, et *AtMAP65-4* dans le fuseau mitotique en prophase (pro fuseau), métaphase et anaphase (demi-fuseaux) et leurs rôles potentiels dans la mise en place du fuseau mitotique nous ont amenés à nous poser la question d'une relation entre ces protéines. De plus il est décrit que dans les cellules animales, Aurora phosphoryle des protéines du cytosquelette. Par exemple, la phosphorylation de MCAK par une Aurora kinase régule sa localisation et inhibe son activité (Andrews *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données nous a amené à rechercher si *AtMAP65-4* pouvait-être un substrat d'*AtAuroras* ?

2. Résultats

2.1 Tests de phosphorylation *in vitro*

Les substrats des Auroras de plantes n'ayant pas encore été identifiés et l'homologie de séquence étant très grande entre les Auroras A et B humaines et les Auroras 1 et 2 d'*Arabidopsis*, nous avons dans une étape préliminaire étudié la phosphorylation d'*AtMAP65-4 in vitro* par les Auroras A et B humaines (clones d'Auroras A et B donnés par Fabienne Hans et Stephan Dimitrov, IAB Grenoble).

Après expression et purification des Auroras A et B, nous avons contrôlé leur activité sur l'histone H3 humaine qui est un substrat connu. Ensuite, nous avons procédé à des essais de phosphorylation d'*AtMAP65-4 in vitro*. Lors de ces tests, de l'ATP radiomarqué est incubé en présence de la kinase et de la MAP. La réaction de phosphorylation entraîne le transfert du phosphore radiomarqué en position gamma de l'ATP vers la protéine cible. Après incubation des réactants, c'est donc la présence ou non de radioactivité au niveau des MAPs qui nous permet de dire s'il y a eu phosphorylation ou pas par les kinases. Lors de cette analyse, les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE avant de quantifier le niveau de radiomarquage pour chacune des protéines. Les résultats obtenus montrent qu'*AtMAP65-4* est phosphorylée par les Aurora As (non illustré) et B (Figure 14) humaines dans son domaine « 3 » et plus précisément la partie C-terminale de ce domaine (domaine 3C, Figure 14A). En effet, la phosphorylation du domaine «3» est très marquée alors que les tests effectués avec les domaines «3N» ou «Δ3C», qui ne contiennent pas le domaine «3C», montrent un marquage faible (Figure 14).

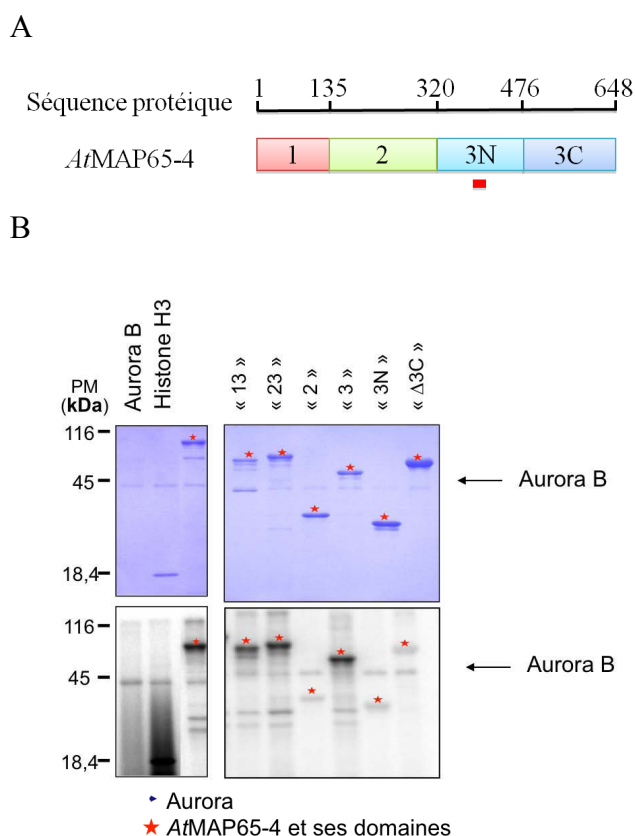


Figure 14: Essais de phosphorylation d'*At*MAP65-4 et ses différents domaines par Aurora B.

A Représentation schématique d'*At*MAP65-4 et de ses différents domaines.

B Après incubation des différentes constructions d'*At*MAP65-4 avec AuroraB en présence de phosphate P^{32} , les protéines sont précipitées avant leur analyse par SDS-PAGE. Une autoradiographie du gel SDS permet de repérer l'incorporation du phosphate au sein des constructions d'*At*MAP65-4 phosphorylées. *At*MAP65-4 et ses différents domaines sont repérés par des étoiles rouges. Se reporter au Chapitre Matériels et Méthodes § 4.2 pour une description précise du mode opératoire.

Ces résultats encourageants nous ont amenés à poursuivre les essais de phosphorylation avec les Auroras kinases d'*Arabidopsis*. Nous avons obtenus les clones d'*At*Aurora1 et *At*Aurora2 via l'institut Riken. Après clonage dans un plasmide d'expression, nous avons exprimé et purifié les protéines recombinantes dans le système *Escherichia coli* (Figure 15). La première étape de purification consiste en une chromatographie par pseudo affinité sur colonne de nickel. Lors de celle-ci, la capture des protéines recombinantes s'effectue grâce aux étiquettes histidines flanquées aux extrémités N- et C-terminales de la protéine. En fin de purification, après dialyse dans un tampon compatible (cf. Matériels et Méthodes) avec celui des *At*MAP65s, la pureté de l'échantillon n'est pas optimale et il reste de nombreuses protéines contaminantes (Figure 15A). Une seconde chromatographie par exclusion de taille nous a permis ensuite de séparer la kinase des protéines contaminantes et d'obtenir un échantillon pur (Figure 15B). Les résultats obtenus avec la purification d'*At*Aurora 2 sont comparables et ne sont pas illustrés.

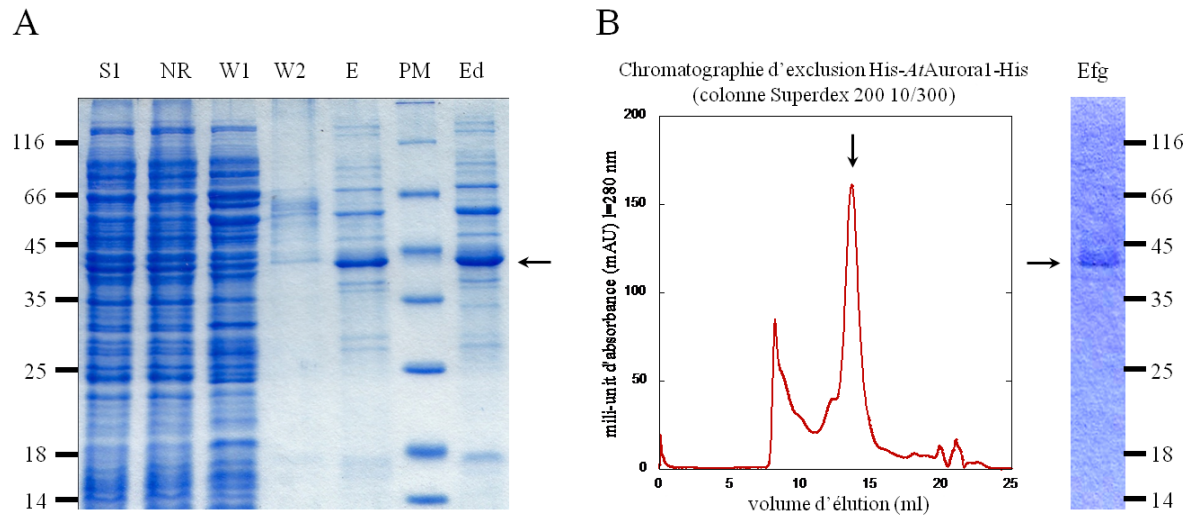


Figure 15: Purification d'*AtAurora1*.

A. Analyse par gel SDS-PAGE des différentes étapes de purification par chromatographie sur colonne de nickel d'*AtAurora1* double étiquetée (séquences de 6 histidines placées en N- et C-terminals de la protéine). Détail des différentes fractions collectées au cours de la purification, S1 : fraction soluble ; NR : fraction non retenue par la colonne ; W1 et W2 : fractions éluées en début et fin de lavage ; E : fraction éluee ; Ed : fraction après dialyse d'*AtAurora1* dans le tampon compatible avec celui d'*AtMAP65-4*. La protéine majoritaire dans les fractions d'élution possède une masse moléculaire apparente proche de 45 kDa attendue pour *AtAurora1* double étiquetée histidine.

B. Profil d'élution de la fraction dialysée d'*AtAurora1* purifiée par chromatographie sur gel d'exclusion. Le pic d'absorbance maximal (voir flèche) correspond à la fraction d'*AtAurora1*. Le contrôle final de la purification est réalisé par gel SDS-PAGE.

Nous avons alors procédé à des tests de phosphorylation *in vitro* d'*At*MAP65-4 par les kinases *At*Aurora 1 et 2. Les résultats montrent une phosphorylation dans le domaine C-terminal d'*At*MAP65-4, de manière comparable aux expériences effectuées avec les Auroras humaines. Seuls les résultats obtenus avec *At*Aurora1 sont illustrés Figure 16.

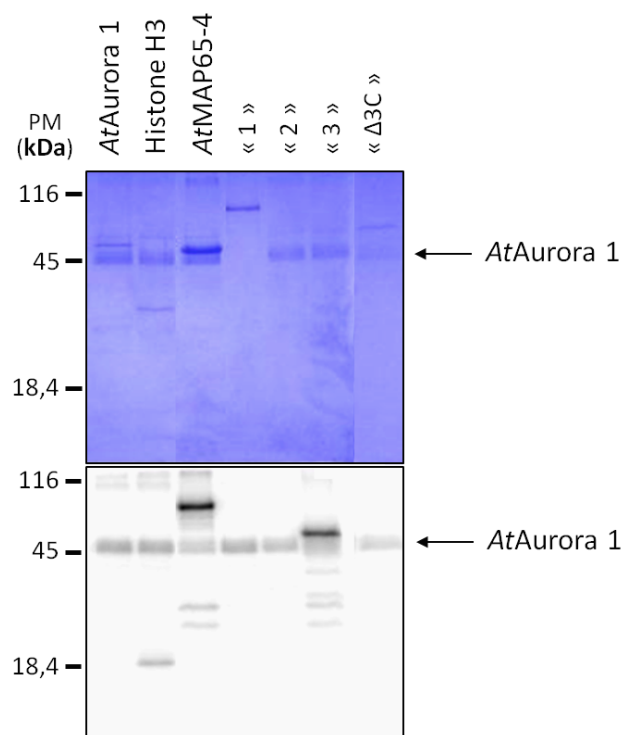


Figure 16: Essais de phosphorylation d'*At*MAP65-4 et ses différents domaines par *At*Aurora 1.

Les différents essais de phosphorylation sont analysés par SDS-PAGE et par autoradiographie. Ce reporter au Chapitre Matériels et Méthodes pour une description précise du mode opératoire.

Afin d'identifier les sérines phosphorylées par les *At*Aurora 1 et 2, Michel Jaquinod (laboratoire EdyP, CEA - Grenoble) a réalisé une analyse comparative par spectrométrie de masse d'*At*MAP65-4 dans un état phosphorylé ou non. Comme attendu, la phosphorylation par les *At*Aurora 1 et 2 se retrouve dans l'extrémité C-terminale d'*At*MAP65-4. Ainsi, les résultats font apparaître deux sérines phosphorylées aux positions 493 et 528 par *At*Aurora 2 et par l'Aurora B humaine. De plus, *At*Aurora 1 est capable de phosphoryler une sérine supplémentaire S539 (Figure 17). La détermination des sérines phosphorylées par Aurora A n'a pas été réalisée.

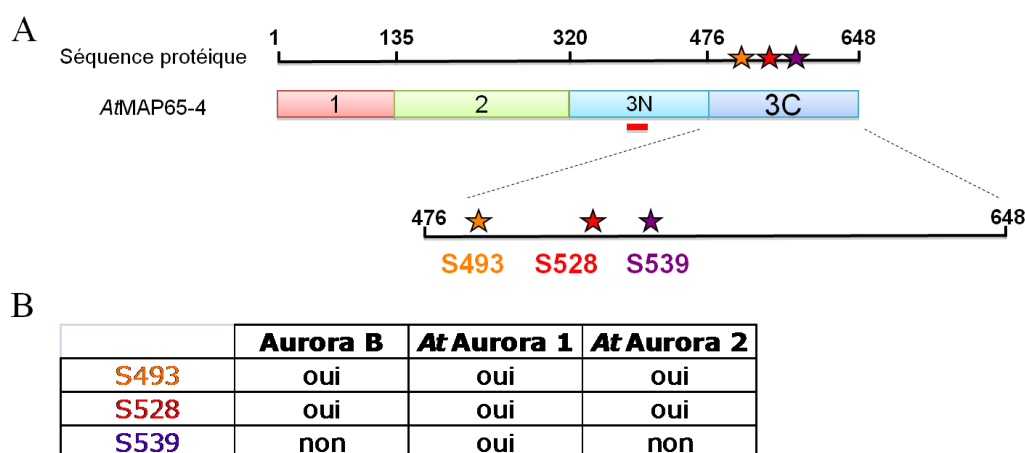


Figure 17: Sites de phosphorylation d'AtMAP65-4 par Aurora B et AtAurora 1&2.

A Représentation schématique de la séquence protéique d'AtMAP65-4 et de ses différents domaines. Les sérines phosphorylées *in vitro* par les AtAuroras kinases 1 et 2 et par Aurora kinase B humaine sont indiquées.

B Tableau récapitulatif de l'activité des différentes Auroras kinases testées.

La localisation des acides aminés phosphorylables par AtAurora 1 et 2 étant restreinte au domaine C-terminal d'AtMAP65-4, en aval du domaine de liaison aux MTs, nous nous sommes intéressés à la possible conservation de ces sites de phosphorylation entre les différents membres de la famille des AtMAP65s. Pour cela, nous avons effectué des alignements de séquence entre les différentes AtMAP65s (Figure 18A). Le domaine de liaison aux MTs, souligné en rouge, correspond à une séquence conservée entre les différentes AtMAP65s alors que le domaine en aval correspond à une séquence spécifique à AtMAP65-4. Cette séquence correspond à une séquence déstructurée (Figure 18B). En conséquence, seule la présence de la sérine 528, phosphorylable chez AtMAP65-4, est retrouvée chez AtMAP65-1. Une étude permettra de vérifier si ce site est également phosphorylable chez AtMAP65-1. Les sérines 493 et 539 apparaissent comme spécifiques à AtMAP65-4.

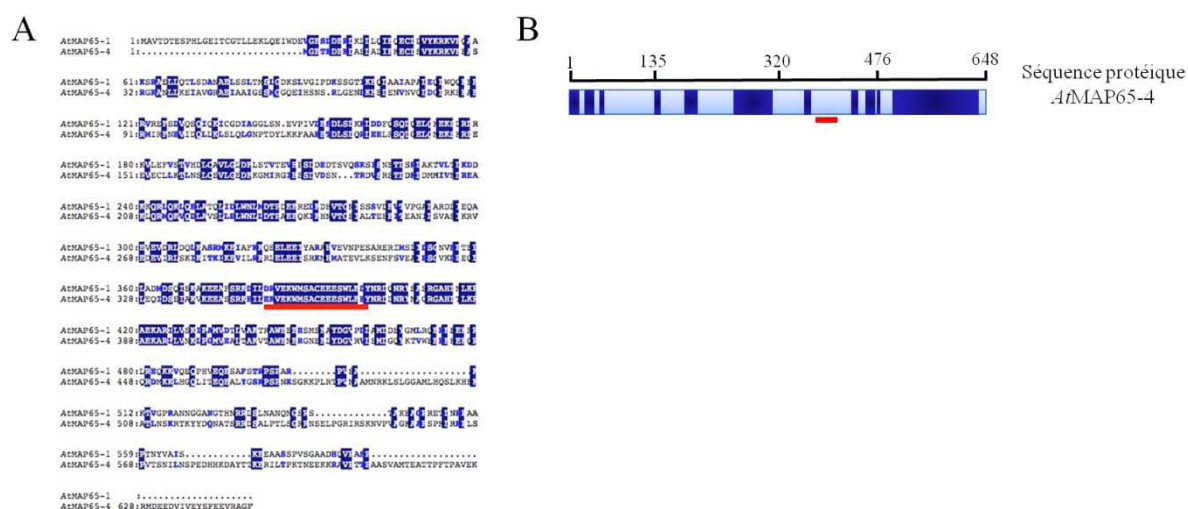


Figure 18: Analyse des séquences protéiques d’*AtMAP65-4* et *AtMAP65-4*.

A Comparaison des séquences d’*AtMAP65-1* et *AtMAP65-4*. La région soulignée est conservée au cours de l’évolution entre les différentes *AtMAP65s*. Les acides aminés identiques entre les 2 *AtMAP65s* sont encadrés en bleu foncé et les acides aminés similaires sont présentés en bleu clair.

B Analyse bioinformatique de la structure secondaire potentielle d’*AtMAP65-4* par le logiciel « DisEmbl[®] » (Linding *et al.*, 2003). Les régions ne présentant pas de structure définie sont appelées régions déstructurées. Elles apparaissent en bleu foncé sur le schéma représentant la séquence d’*AtMAP65-4*.

Ces phosphorylations jouent-elles un rôle dans le contrôle de l’activité d’*AtMAP65-4* ?
Peuvent-elles induire une structuration du domaine 3C majoritairement déstructuré directement ou par le biais d’un partenaire reconnaissant une nouvelle conformation ? Dans un premier temps nous avons testé l’activité des protéines phosphorylées sur leur capacité à induire la formation de faisceaux de MTs *in vitro*. Ensuite nous avons abordé l’étude de l’effet de la phosphorylation dans un contexte *in vivo*.

2.1.2 Etude de l’effet de la phosphorylation d’*AtMAP65-4* *in vitro*

Dans les différents essais réalisés *in vitro*, *AtMAP65-4* a été préalablement phosphorylée *in vitro* par les différentes *AtAuroras* testées avant son incubation avec des MTs préformés et stabilisés par du taxol.

Dans une première étape, nous avons testé l’effet de la phosphorylation d’*AtMAP65-4* sur sa capacité à se lier aux MTs. Pour cela nous avons procédé à des essais de cosédimentation à forte vitesse : MAP phosphorylée - MTs. Les résultats montrent qu’*AtMAP65-4* phosphorylée par les différentes Auroras testées, se lie aux MTs de façon comparable à la forme non phosphorylée.

Dans une seconde étape, nous avons déterminé l'influence de la phosphorylation d'*AtMAP65-4* sur ses propriétés d'organisation des MTs en faisceaux. Deux types d'expériences ont été mises en œuvre : des essais de cosédimentation à faible vitesse et des observations en microscopie à fluorescence. Les données obtenues montrent qu'*AtMAP65-4* phosphorylée par *AtAurora 1* ou par *AtAurora 2* a conservé sa capacité à organiser les MTs en faisceaux (Figure 19).

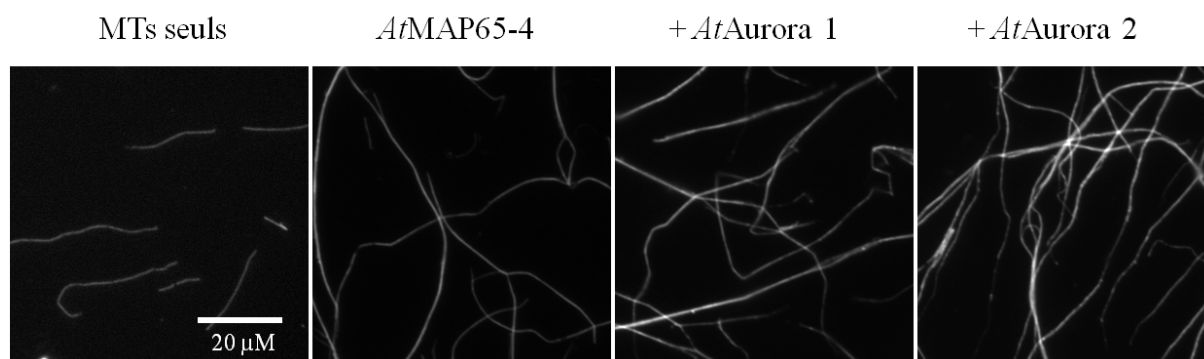


Figure 19: Test d'activité *in vitro* d'*AtMAP65-4* après sa phosphorylation par les *AtAuroras*.

Observation en microscopie à fluorescence de MTs - rhodamine (0.5 μ M) seuls ou après incubation avec *AtMAP65-4* phosphorylée (0.5 μ M) par *AtAurora 1* ou *AtAurora 2*.

En conclusion, la capacité d'*AtMAP65-4* d'induire la formation de faisceaux de MTs *in vitro* n'est pas affectée par son état de phosphorylation par les *AtAuroras 1* et *2*. Cependant, ceci ne signifie pas que la phosphorylation ne possède pas d'importance *in vivo*, dans un contexte où des partenaires pourraient reconnaître les modifications post traductionnelles de la MAP et modifier indirectement son activité.

2.2 Etude de l'effet de la phosphorylation d'*AtMAP65-4* *in vivo*

Afin d'étudier le rôle de la phosphorylation d'*AtMAP65-4* *in vivo*, nous avons choisi d'analyser l'effet de la phosphorylation d'*AtMAP65-4* sur sa localisation cellulaire, sur l'organisation du fuseau mitotique et le déroulement de la mitose dans deux types cellulaires distincts : 1) analyse dans des cellules d'*Arabidopsis in planta* et 2) analyse dans des cellules de tabac BY-2 en culture.

2.2.1 Analyse *in planta* de l'effet de la phosphorylation d'*AtMAP65-4*

Les plantes KO insertionnel *Atmap65-4* exprimant de la tubuline fusionnée à la GFP (cf Chapitre I, paragraphe 4) ont été supplémentées par des constructions d'*AtMAP65-4* présentant des mutations ponctuelles des différentes sérines phosphorylables *in vitro* par les *AtAuroras* 1 et 2 seules ou en combinaison. Nous avons choisi d'exprimer des versions d'*AtMAP65-4* non phosphorylables ou mimant au contraire une phosphorylation constitutive. Pour mimer une phosphorylation constitutive, j'ai muté les trois sérines phosphorylables en acide aspartique alors que pour mimer un état non phosphorylable, les sérines ont été modifiées en alanine.

A titre de contrôle, les différentes protéines mutées correspondant aux différents états possibles de phosphorylation d'*AtMAP65-4* par les *AtAurora* 1 et 2 ont été exprimées dans le système *E. coli* et purifiées par chromatographie dans le but de comparer leur activité avec *AtMAP65-4* phosphorylée par les *AtAuroras* 1 et 2 *in vitro*. Des résultats identiques ont été obtenus, à savoir pas de changement d'activité sur la formation de faisceaux de MTs *in vitro* (Figure 20).

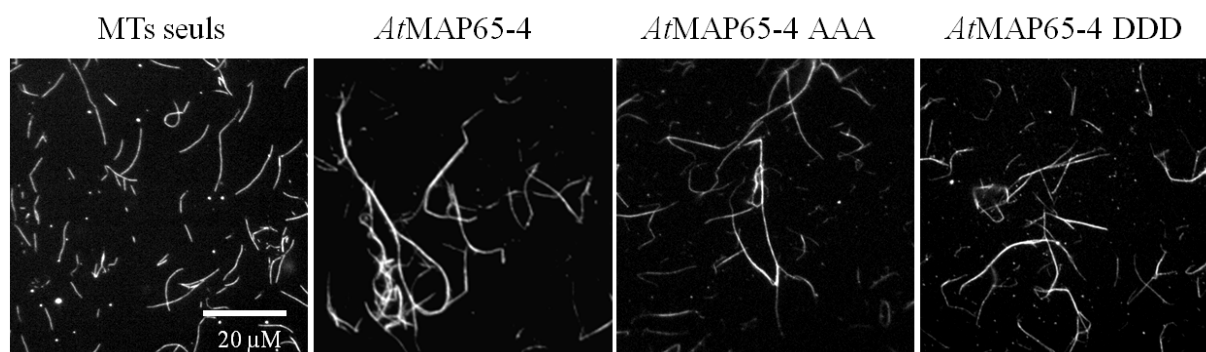


Figure 20: Test d'activité *in vitro* des différents mutants d'*AtMAP65-4* pour la phosphorylation.

Observation en microscopie à fluorescence de MTs - rhodamine (0.5 µM) seuls ou après incubation avec *AtMAP65-4* et ces versions mutées pour la phosphorylation (0.5 µM). Le mutant non phosphorylable de la MAP est appelé AAA (pour triple mutation de sérine en alanine) et le mutant mimant une phosphorylation constitutive est appelé DDD (pour triple mutation de sérine en aspartate).

In planta, pour nous rapprocher d'un niveau d'expression d'*AtMAP65-4* le plus fidèle possible, nous avons placé l'expression des ADNc codants pour les protéines mutées sous le contrôle du promoteur natif d'*AtMAP65-4*. Pour ce faire nous avons cloné les 1400 paires de bases situées en amont du codon initiateur d'*AtMAP65-4*. En position aval, nous avons

fusionné *AtMAP65-4* au gène codant pour la protéine fluorescente mCherry afin de visualiser sa localisation dans les cellules aux différents stades de développement de la plante. L'intérêt d'utiliser des plantes mutées est de pouvoir analyser les effets d'*AtMAP65-4* muté et fluorescent en l'absence d'*AtMAP65-4* endogène. Les cellules ne possèdent alors que la forme mutée (phosphorylée ou non phosphorylable) d'*AtMAP65-4* et non un potentiel mélange avec la protéine native. Le phénotype de la plante ne dépendra donc que de la construction supplémentée.

Les premières analyses des plantes supplémentées par *AtMAP65-4*-mCherry et par les formes mutées décrites ci-dessus, ne nous ont pas permis jusqu'ici de détecter de signal fluorescent correspondant aux différentes *AtMAP65-4*s transfectées. Ces analyses demandent cependant à être approfondies. Dans l'état actuel de nos observations, l'hypothèse la plus probable permettant d'expliquer la non détection des protéines supplémentées est la non fonctionnalité du promoteur que nous avons choisi de placer en amont d'*AtMAP65-4*. Pourtant la validité du protocole n'est pas remise en cause car il a été appliqué à l'observation d'*AtMAP65-1*-mCherry supplémentée dans des plantes mutantes KO insertionnel avec succès dans l'équipe.

2.2.2 Analyse de cellules de tabac BY-2 transfectées par les mutants d'*AtMAP65-4* pour la phosphorylation

Du fait de la localisation particulière d'*AtMAP65-4* avec des populations de MTs distinctes au sein du fuseau mitotique, nous avons choisi également comme modèle d'étude les cellules BY-2 de tabac en culture. Ces cellules se prêtent tout particulièrement à l'observation du cytosquelette au cours du cycle cellulaire notamment pour leur relative grande taille, l'organisation linéaire des cellules facilitant les observations (versus formation d'aggrégats), leur index mitotique élevé et leur absence d'auto-fluorescence. Les transfections cellulaires des différentes constructions d'*AtMAP65-4* mutées (cf ci-dessus) sous la dépendance d'un promoteur constitutif fort (CMV) sont en cours en collaboration avec D. Geelen et D. Van Damme (Gand, Belgique). Jusqu'ici aucune donnée n'a encore été obtenue.

3. Discussion

Au cours de cette étude, nous avons pu montrer qu'*AtMAP65-4* est substrat *in vitro* des Aurora kinases 1 et 2 d'*Arabidopsis*. A notre connaissance, *AtMAP65-4* est le premier substrat de ces enzymes décrit chez les plantes, à l'exception des histones H3. Elles phosphorylent spécifiquement des sérines présentes dans le domaine C-terminal d'*AtMAP65-4* et présentent des différences quant aux sérines phosphorylées. En effet, *AtAurora 2* phosphoryle deux sérines et *AtAurora 1* phosphoryle trois sérines : les deux mêmes que celles phosphorylées par *AtAurora 2* et une sérine supplémentaire. De plus, des interactions moléculaires entre des *AtAuroras* avec *AtMAP65-4* ont été observées par double hybride chez la levure (Bruno Favery, communication personnelle).

Les *AtAuroras* possèdent une grande homologie de séquence notamment dans leur domaine catalytique. Les séquences des domaines catalytiques des *AtAuroras* sont également très proches entre les espèces comme entre *Arabidopsis* et les mammifères où on observe plus de 80% des positions des acides aminés identiques. Au cours de l'évolution les séquences des Aurora kinases ont donc été conservées. Les différences entre les isoformes se situent au niveau de leurs localisations cellulaires et de leurs partenaires protéiques. Les deux *AtAuroras* phosphorylent différemment *AtMAP65-4 in vitro*, ce qui suggère deux modes de régulation de la liaison d'*AtMAP65-4* aux MTs ou de son activité. En l'absence de données *in vivo*, il est difficile d'émettre des hypothèses quant au rôle respectif des différentes phosphorylations et de leur importance physiologique.

Dans les essais *in vitro* que nous avons réalisés, les différentes phosphorylations d'*AtMAP65-4* n'ont pas affectées sa capacité à induire des faisceaux de MTs. Pour compléter cette étude, il faudrait contrôler que la phosphorylation d'*AtMAP65-4* n'affecte pas son effet sur la dynamique des MTs au sein des faisceaux qu'elle induit, ou encore si l'affinité de sa liaison avec les MTs n'est pas modifiée. En effet, nous avons observé sa capacité à induire des faisceaux après 30 min d'incubation avec des MTs stabilisés par du taxol mais nous n'avons pas suivi en temps réel la formation des faisceaux, leur dynamique, la polarité des MTs, et le temps de liaison d'*AtMAP65-4* phosphorylée lorsqu'associée avec des MTs dynamiques (en phase d'élongation). Avant de conclure que l'état de phosphorylation d'*AtMAP65-4* n'affecte pas son activité *in vitro*, ces études devraient être réalisées.

Cependant, les données obtenues *in vitro* suggèrent que la phosphorylation d'*AtMAP65-4* pourrait ne pas avoir d'effets directs sur l'activité d'*AtMAP65-4*, mais pourrait entraîner le recrutement de protéines partenaires qui modifieraient par exemple l'affinité de liaison de

cette MAP aux MTs. Une donnée intéressante serait de connaître quelle est la conformation tridimensionnelle de la MAP dans la région phosphorylée : s'agit t-il de sites exposés à la surface de la protéine ou de sites enfouis ? La phosphorylation est-elle accessible à des protéines partenaires ou peut-elle entraîner un réagencement de la structure de la protéine ? Pour répondre à ces questions une analyse précise de la structure d'*AtMAP65-4* est nécessaire. Des essais de cristallisation ont été réalisés au laboratoire qui non jusqu'ici donné aucun résultat. L'utilisation de logiciels de prédiction structure tridimensionnelle tel que « DisEmbl[®] » (Linding *et al.*, 2003) fait apparaître de nombreux domaines d'*AtMAP65-4* ne possédant pas de repliement bien défini comme les hélices α et les feuillets β (domaines déstructurés : Figure 18B, page 76). A partir de ces données, on peut suggérer que la présence des domaines désordonnés peut être en partie responsable des échecs de cristallisation.

La partie C-terminale en aval de la séquence conservée apparaît totalement déstructurée et de plus courtes séquences déstructurées sont aussi présentes dans le reste de la séquence. Le repliement des domaines déstructurés peut être induit par l'interaction avec un ou plusieurs ligands (Receveur-Brechot *et al.*, 2006). Ainsi ces domaines pourraient acquérir une structure lorsqu'ils se lient à des partenaires physiologiques (la tubuline et ou des protéines régulatrices) et conférer une conformation active à *AtMAP65-4* selon les ligands considérés (Receveur-Brechot *et al.*, 2006). Une autre indication de la présence de domaines déstructurés est la migration anormale d'*AtMAP65-4* lors de sa purification par chromatographie d'exclusion : elle est éluée dans une fraction correspondant à des protéines de poids moléculaires proche de 500kDa alors qu'elle a une masse théorique de 80kDa (logiciel «Protparam[®]»). C'est une des caractéristiques des protéines totalement ou partiellement déstructurées qui présentent une forme filamenteuse plutôt que globulaire (Receveur-Brechot *et al.*, 2006). Des données obtenues récemment au laboratoire montrent qu'*AtMAP65-1* et *-5* sont des monomères en solution et se comportent comme des oligomères lors de chromatographie d'exclusion (Gaillard *et al.*, 2008). Cependant on ne peut exclure que le haut poids moléculaire d'*AtMAP65-4* corresponde à une homo-oligomérisation (pentamère, hexamère ?). Dans ce contexte, il faudra déterminer le degré d'oligomérisation d'*AtMAP65-4* par des méthodes basées sur la centrifugation analytique par exemple.

Lorsqu'on relie l'activité d'*AtMAP65-4* avec sa localisation cellulaire, nous pouvons émettre l'hypothèse que sa phosphorylation pourrait activer une régulation spatiale et/ou temporelle de son activité (organisation des MTs en faisceaux, régulation du comportement dynamique des MTs au sein des faisceaux) au cours de la prophase (formation du fuseau mitotique) et de la proméphase à l'anaphase (fibres kinétochoriennes). En effet, la dynamique des fibres

kinétochoriennes doit être parfaitement régulée : dans un premier temps lors de son établissement, puis ensuite lors de la traction des chromosomes aux pôles liée à leur dépolymérisation synchrone en anaphase.

CHAPITRE III

Modélisation de l'activité d'*At*MAP65-4

1. Introduction

La description des effets d'*At*MAP65-4 sur le comportement dynamique des MTs au sein des faisceaux qu'elle induit et plus globalement du comportement dynamique de l'ensemble des faisceaux nous ont permis d'émettre plusieurs hypothèses quant au mécanisme d'action d'*At*MAP65-4 à l'échelle moléculaire. Nous avons notamment formulé l'hypothèse selon laquelle la MAP agit comme un frein lors des phases de dépolymérisation, telle une agrafe qui empêcherait d'ouvrir une fermeture éclair (cf conclusion Chapitre I). Par ailleurs, si nous avons pu déterminer qu'*At*MAP65-4 modifiait les propriétés dynamiques des MTs, nous ne possédons que peu de données quant à sa propre dynamique. De plus, bien que nous ayons visualisé la cinétique de liaison d'*At*MAP65-4 au cours de l'élongation de faisceaux de MTs, nous ne pouvons pas conclure si le mode de liaison d'*At*MAP65-4 aux MTs suit un comportement coopératif ou non. Ainsi, à l'échelle moléculaire de nombreuses questions restent posées quant au mécanisme d'action d'*At*MAP65-4 en particulier et des MAP65s en général. Pour répondre à ces questions, les moyens à mettre en œuvre sont importants et de plus, l'accès à certaines informations est exclu faute de moyens matériels. Afin de palier à ces limitations et de proposer un modèle d'étude alternatif, nous avons établi une simulation numérique de la dynamique d'assemblage des faisceaux de MTs en présence d'*At*MAP65-4. Cette modélisation *in silico* de notre système expérimental biomimétique (Cf Chapitre I) a été réalisée en collaboration avec Jean-Louis Martiel et Virginie Stoppin-Mellet. Pour ce projet, nous avons exploré le mécanisme d'activité potentiel d'*At*MAP65-4 que nous avons comparé à celui d'*At*MAP65-1 étudiée par Virginie Stoppin-Mellet. Dans un premier temps, la mise en place du modèle sera décrite puis les résultats seront présentés sous la forme d'un article de recherche soumis pour publication.

1.1. Mise en place du modèle : polymérisation de microtubules individuels

Le point de départ du modèle est basé sur nos observations du comportement d'instabilité dynamique de MTs individuels (Cf Chapitre I). Trois états sont observés aux extrémités (+) et (-) des MTs : des phases de polymérisation, de dépolymérisation et des pauses. Ces trois phases se succèdent aléatoirement mais nous avons identifié des paramètres constants : les vitesses de polymérisation et dépolymérisation des MTs, les fréquences d'apparition des événements de catastrophe et de sauvetage. Le caractère stochastique de la polymérisation de MTs est apporté par la variabilité des durées des phases de polymérisation et de raccourcissement. Nous avons mesuré ces durées aux deux extrémités lors d'expériences contrôles dans lesquelles de courts MTs stables sont allongés par l'addition de tubuline libre. La distribution des durées de polymérisation et dépolymérisation a ensuite été ordonnée sur une courbe mathématique qui nous permet, dans les simulations, de « tirer au sort » la durée correspondant à un événement de polymérisation ou dépolymérisation. Cette observation est la base du modèle de polymérisation des MTs, qui prend donc en compte les paramètres constants (vitesses de polymérisation, dépolymérisation ; fréquences d'apparition des événements de catastrophe et sauvetage) et les paramètres aléatoires (durées des phases de polymérisation, dépolymérisation et pause) mesurés expérimentalement. L'enchaînement des différentes phases au cours du temps est prédite par une matrice de transition qui autorise ou interdit le passage d'une phase vers une autre. Ainsi, une phase de dépolymérisation sera autorisée à la suite de la polymérisation mais une phase de pause sera par exemple interdite à la suite de la polymérisation à l'extrémité (+) des MTs. En effet, cet enchaînement n'a jamais été observé lors de nos expériences *in vitro*. Lors d'une étape préliminaire, nous avons analysé les données obtenues lors de simulations de l'assemblage de MTs individuels à partir d'amorces stables. Les résultats obtenus (cf paragraphe 3, article en cours de soumission) sont comparables aux observations réalisées lors des expérimentations et valident donc notre modèle de dynamique d'assemblage des MTs.

1.2. Mise en place du modèle : ajout des *AtMAP65s*

Lors de nos expériences sur le suivi de la cinétique d'assemblage de faisceaux de MTs induit par *AtMAP65-4* (cf Chapitre I), nous procédons en 2 étapes : 1- de courts faisceaux de MTs stables (amorces de faisceaux) sont générés en présence d'*AtMAP65-4*, 2- avant leur

incubation en présence de tubuline soluble qui induit l'élongation des MTs, et la présence de concentrations variées d'*At*MAP65-4 permettant d'établir des liaisons entre les MTs. Ainsi, le modèle doit rendre compte de la liaison d'*At*MAP65-4 avec les MTs stables pour former des faisceaux d'amorces, puis ensuite, de sa liaison le long des MTs en croissance. Afin de rendre compte de la dynamique d'un faisceau de MTs nous avons implémenté au modèle de polymérisation de MTs à partir d'amorces (cf paragraphe précédent), la liaison dynamique d'*At*MAP65-4 ou d'*At*MAP65-1 sous forme dimérique entre 2 MTs adjacents. Nos données expérimentales montrent qu'*At*MAP65-4 se lie indifféremment à des MTs de même polarité ou de polarité opposée, alors qu'*At*MAP65-1 semble se lier uniquement avec des MTs de polarité opposée. Ces données ont été introduites dans la modélisation.

Dans le modèle qui est purement cinétique, la liaison des *At*MAP65s répond à la loi d'action de masse et, est régie par la concentration des MAPs et leurs constantes d'association (kon) et de dissociation (koff) avec les MTs. Nous n'avons pas pu déterminer précisément les valeurs des kon et koff d'*At*MAP65-4 ou d'*At*MAP65-1 expérimentalement, cependant certaines données obtenues chez des protéines homologues nous permettent de borner ces valeurs. Lors de mesures de FRAP nous n'avons pas observé de retour de fluorescence de GFP-*At*MAP65-1 ou GFP-*At*MAP65-4 même 35 min après l'extinction de la fluorescence (Cf Chapitre I ; § résultats de l'article ci-dessous). Ces valeurs nous ont permis de proposer un koff théorique inférieur à 5.10^{-4} s^{-1} . Cette valeur est à comparer avec les travaux de Ross *et al.*, (2004) qui ont mesuré un koff de $3,9.10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Par ailleurs, les mesures des constantes d'affinité (ou Kd) de *Nt*MAP65-1b (0,5 μM , Wicker-Planquart *et al.*, 2004) et Ase1p (0,3 μM , Schluyer *et al.*, 2006) nous permettent d'approximer un kon de $10^{-3} \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ pour les deux *At*MAP65s étudiées.

Afin d'implémenter au modèle l'effet d'*At*MAP65-4 sur le comportement dynamique des MTs, nous avons appliqué une probabilité de détachement de MAP (ou « pRemoval ») sous l'effet d'une dépolymérisation d'un MT jusqu'au site de fixation de la MAP. En effet, *At*MAP65-4 diminue la fréquence des événements de catastrophe mais ne les abolit pas. Par exemple, dans le cas où ce paramètre prendrait la valeur de 0,8, la première MAP exposée à la dépolymérisation suite à une catastrophe aurait 80% de probabilité d'être détachée puis la seconde MAP aurait également 80 % de chance d'être détachée et ainsi de suite. Dans le cas où la MAP ne serait pas détachée, celle-ci bloquerait la propagation de la dépolymérisation du MT et favoriserait une nouvelle polymérisation (événement de sauvetage). Lorsque la probabilité de détachement de la MAP est égale à 1 alors toutes les MAPs vont se détacher les unes après les autres lors de la dépolymérisation du MT. Au contraire, si « pRemoval » est

nul, la présence d'une seule MAP empêchera de dépolymériser le MT.

De plus, le modèle possède plusieurs autres paramètres variables comme le nombre de MTs dans les faisceaux, la densité de MAP le long de MTs ou le facteur de coopérativité de liaison des MAPs. Lors des premières simulations, nous avons recherché les valeurs de ces paramètres dans le but de se rapprocher au maximum des observations expérimentales. Afin de comparer les données simulées aux résultats expérimentaux, nous avons choisi de comparer les longueurs des faisceaux. Les longueurs expérimentales sont confrontées aux longueurs simulées et la différence de ces valeurs nous permet de dégager une valeur d'erreur. Plus cette erreur est grande, plus le modèle diffère de l'expérience et inversement. Des boucles de simulations sont donc réalisées pour identifier les valeurs des variables du modèle rendant compte le plus fidèlement possible des résultats expérimentaux. Ce travail a été réalisé pour plusieurs concentrations d'*AtMAP65-4* et *AtMAP65-1*, les résultats obtenus et leur comparaison sont présentés dans le manuscript « Efficient synchronization of microtubule growth in MAP65s cross-linked bundles » soumis pour publication.

2. Résumé

Chez les eucaryotes, les réseaux de MTs constituent une architecture moléculaire impliquée dans de nombreux processus cellulaires, y compris la morphogenèse cellulaire, l'établissement de la polarité cellulaire et la division cellulaire. L'activation de ces fonctions cellulaires dépend souvent de la capacité des réseaux de MTs à s'auto-organiser en structures d'ordre supérieur. Cela est particulièrement vrai pour les cellules acentrosomales, telles que les cellules végétales où les réseaux de MTs ne sont pas issus d'un centrosome. Au lieu de cela, ils sont principalement auto-organisés en faisceaux de MTs très dispersés dans le cortex cellulaire pendant l'interphase ou organisés en fuseau mitotique lors de la mitose. Afin de mieux comprendre les mécanismes de formation de faisceaux de MTs, nous avons étudié deux protéines de plante associées aux microtubules, *AtMAP65-1* et *AtMAP65-4*, qui appartiennent à la famille des MAP65s conservées au cours de l'évolution. *AtMAP65-1* favorise la formation de faisceaux de MTs de polarités opposées *in vitro* et est associée aux MTs corticaux pendant l'interphase et avec les MTs interzonaux au cours de l'anaphase (Gaillard *et al.*, 2008). *AtMAP65-4* forme des faisceaux de MTs parallèles et antiparallèles *in vitro* et est associée aux fibres kinétochoriennes lors de la mitose (Fache *et al.*, 2010). Pour étudier comment ces *AtMAP65s* génèrent des faisceaux de MTs et influencent leur dynamique, nous avons développé un test *in vitro* utilisant la microscopie TIRF. Les résultats

majeurs obtenus montrent qu'elles provoquent une diminution de la fréquence des événements de catastrophe, une augmentation de la fréquence d'événements de sauvetage et une disparition des pauses. Des simulations cinétiques réalisées à partir des données expérimentales obtenues, confirment le rôle d'*AtMAP65-1* et d'*AtMAP65-4* dans la synchronisation du comportement dynamique des MTs voisins conduisant à une croissance progressive des faisceaux de MTs. Elles suggèrent qu'*AtMAP65-1* n'induit pas strictement la formation de faisceaux de MTs antiparallèles, mais qu'un faible pourcentage de MTs de même polarité sont toujours présents dans les faisceaux. De plus, la dynamique des MTs organisés en faisceau est modulée par la polarité de leurs voisins, ainsi la vitesse de croissance de MTs antiparallèles sera limitée par la vitesse de polymérisation à l'extrémité (-). Dans le cas d'associations parallèles, la vitesse de croissance du faisceau de MT est plus grande et dépend de la vitesse de polymérisation à l'extrémité (+).

3. Article

Efficient synchronization of microtubule growth in MAP65s cross-linked bundles

V Stoppin-Mellet*§||, V Fache*§, D Portran*, JL Martiel*, M Vantard*||

* Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant-iRTSV,
CEA/CNRS/INRA/Université Grenoble 1, Grenoble 38054, France

§ Equal contribution

|| Corresponding authors: Virginie Stoppin-Mellet and Marylin Vantard, iRTSV/PCV, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France; e-mail: virginie.stoppin-mellet@cea.fr; marylin.vantard@cea.fr; Tel: (33) 4 38 78 32 03; Fax: (33) 4 38 78 50 91.

Short title: Dynamics of MAP65s bundled MTs

Abbreviations: MT, Microtubule; MAP65, Microtubule-Associated Protein 65; GFP, Green Fluorescent Protein; TIRFm, Total Internal Reflexion Fluorescence microscopy

Category: Biological Sciences

ABSTRACT

Microtubule (MT) bundling is a crucial step in organizing acentrosomal MT arrays and hinges on the ability of the cytoskeleton to self-organize into higher order structures (Bartolini and Gundersen, 2006; Wasteney, 2010). However, MT growth in bundles, a key process by which MT self-assemble into dynamical networks, remains poorly documented. Here we address the dynamics of MT bundled by two plant members of the evolutionary conserved MAP65 family, MAP65-1 and MAP65-4, MAP65-1 being the ortholog of vertebrate PRC1 and yeast Ase1 (Gaillard, 2008). Indeed, acentrosomal plant MT arrays are mainly composed of self-assembled MT bundles that provide a model system to understand MT self-organization in eukaryote cells. MAP65-1 is associated with cortical MTs, whose polarity remains undefined and with anti-parallel MTs in the spindle midzone, whereas MAP65-4 interacts with parallel MTs in kinetochore fibers (Gaillard, 2008; Fache, 2010). Using biomimetic assays we show that MAP65s cross-linking drives MT dynamics out of the steady state regime observed for unbundled MTs resulting from a reduction of the shrinkage length and the increase of the elongation time. Modeling MAP65 activities demonstrate that MAP65s act as stops that prevent MT from depolymerization, thereby enabling MT regrowth once shrinkage halted. A consequence is a synchronization of MT growth within the bundles.

Furthermore, a tiny but non-negligible fraction of MAP65-1 connecting parallel MT in the bundle is necessary to ensure bundle growth where as MAP65-1 bonds between parallel MTs are less stable than those connecting anti-parallel MTs. Finally, we provide evidences that when MTs depolymerize, the MAP65s removal is due to tubulin dimers detachment from MT lattice.

INTRODUCTION

Microtubules are dynamic polar polymers assembled from heterodimers of α and β tubulin. They exhibit intrinsic dynamic instability by alternating polymerization and depolymerization phases at their plus and minus ends (Mitchison, 1984). In eukaryote cells, MTs coordinate diverse sets of cellular processes, including cell morphogenesis, establishment of cell polarity and cell division. Powering these cellular functions often hinges on the ability of the MTs to self-organize into higher order structures. This is true in particular for most differentiated animal cell types that contain large numbers of MT arrays in a noncentrosomal assembly (i.e. neuronal cells, polarized epithelial cells), most fungi and in plant cells that lack a well-defined MT organizing center (Keating and Borisy, 1999, Bratman and Chang, 2008). In these different eukaryote cells, MT arrays are mainly composed of MT bundles that are aligned or organized into a meshwork and their dynamic feature must underly many of their functions (Bartolini and Gundersen, 2006; Bratman and Chang, 2008). In particular, their assembly and stability must be control by different parameters such as the dynamics of MT growth and shrinkage within the bundles. How the dynamic behavior of the MTs and their polarity within the bundles affects the steady-state of these MT networks and their self-organization into higher order arrays, is a crucial question in cell biology. This work focuses on MT dynamics within bundles.

Recent works have shown that members of the MAP65 family are major MT non-motor cross-linkers in human (PRC1, Mollinari et al., 2002), fungal (Ase1, Janson et al., 2007) and plant cells (MAP65s, Smertenko et al., 2004, Gaillard et al., 2008, Fache et al., 2010). PRC1 and Ase1 are unique where as in the plant model *Arabidopsis thaliana* 9 members are identified (Hussey et al., 2002), MAP65-1 being the ortholog of the human and yeast MAP65s. It colocalizes with cortical MT bundles during interphase, and with the central spindle in anaphase (Van Damme, 2004; Gaillard, 2008). *In vitro*, MAP65-1 cross-links anti-parallel aligned MTs with a spacing between MTs of 30 nm and the cross-bridges form a diagonal pattern connected with the MTs wall at $\sim 60^\circ$ relative to the MT lattice (Gaillard, 2008) as determined recently for PRC1 (Subramanian et al., 2010). In marked contrast with

MAP65-1, MAP65-4 localization is restricted to the forming spindle in prophase and to kinetochore fibers from prometaphase to anaphase. *In vitro*, MAP65-4 randomly bundles both parallel and anti-parallel MTs with a 15 nm inter-MT distance and forms cross-bridges between MTs which are oriented with an angle of 90° relative to the MT lattice (Fache, 2010). In this study, we determined how these two MAP65s regulate the dynamics of MT bundles and MT organization within bundles they induce. From the experimental data we obtained, we then developed a model to account for the observed MAP65-1/4 induced bundle growth and to correlate at the molecular level the polarity and the dynamic properties of individual cross-linked MTs within a bundle.

RESULTS

Dynamics of MTs within bundles

To investigate the mechanisms by which MAP65-1 and MAP65-4 bundle MT and the dynamic instability of individual MT within bundles, we implemented a two-color Total Internal Reflexion Fluorescence microscopy (TIRFm) assay in reconstituted experiments. In the presence of MAP65-1/4, MT elongate constantly (Figure 1A, movies S2 and S3). Corresponding kymographs showed that MTs within MAP65-1/4 induced bundles exhibited mixed polarity (Figure 1B, Figure S1A) in agreement with previous observations (Gaillard, 2008, Fache, 2010). MT growth and shortening rates of bundled MTs were similar to those determined for isolated MTs (Figure S1B). Conversely, the mean elongation duration and depolymerization length of MTs cross-linked by MAP65-1 or MAP65-4 were modified. In the presence of MAP65-1/4, the mean time of MT elongation increased (Figure 1C, D), MT depolymerization lengths greatly reduce after a catastrophe event (Figure 1E, F). When a catastrophe event occurs, bundled MTs shrink on a short distance and elongation almost surely resumes before MTs loose around 40% of their initial length, whereas in the absence of MAP65s, only 20% of MTs loose more than 80% of their initial length (Figure 1C-F). These phenomena are correlated with the age of the MT within the bundle: as time goes on, the maximal MT depolymerization length decreases in the presence of both MAP65s (Figure 1G). This is consistent with the observation that MT elongation exhibits a positive drift over the whole experiment period (Figure S1C). Overall, these data indicate that MAP65s-crosslinking drive dynamics of bundled MTs out of the steady state regime observed for unbundled MTs with a cumulative effect: the depolymerization length after a catastrophe event becomes shorter and shorter as the bundle ages.

Dynamics of MAP65-1 on bundled MTs

Simultaneous time-lapse recording of Alexa 568- tubulin and GFP-MAP65-1 revealed that MAP65-1 binds along MTs and that its binding is almost concomitant with the elongation of MT bundles (Figure S2). Noticeably some MT bundles were lacking of MAP65-1 at their ends (Figure 2A), suggesting that the binding of MAP65-1 to single MTs is very unstable. Similar observations have been done for MAP65-4 (Fache, 2010). Thus MAP65-1/4 selectively accumulate on bundled MTs, as already reported for PRC1 (Bieling, 2010). In FRAP experiments to evaluate the turnover rate of MAP65-1 on MTs, no fluorescence recovery in the photobleached MT bundle was observed, even after 35 min recording (Figure 2D-F), giving a MAP65-1 k_{off} of less than $4.8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. In some cases where fluorescence recovery indeed occurred, the fluorescence signal did not appear uniformly over the bleached area as expected (Figure 2Ga) but rather across the bleached zone from one side to the other one (Figure 2Gb, Figure S3). Such fluorescence recovery event was most likely due to an elongating bundled MTs travelling through the bleached area, and not to MAP65-1 turnover on MTs. So we conclude that *in vitro*, MAP65-1 binds MTs as they elongate. Once bound, MAP65-1 dissociates very slowly unless MTs depolymerize.

MAP65-1 and MAP65-4 have different selectivity for polar and anti-polar MT arrangement within bundles

Because images of MT bundles are quite complex (Figure S3A), it was difficult to reliably follow individual MT dynamics in crowded bundles. Therefore we turned to a model to study the dynamics of cross-linked MTs. This approach not only allows analysis of the behavior of individual MTs into MAP65-1/4 induced bundles, but also provides data to correlate MT dynamics with MAP65-1/4 properties. We first simulated the dynamics of single MTs that elongate from individual stable seed using the polymerization and depolymerization rates, the frequency of catastrophe and rescue events extracted from kymographs corresponding to the dynamics of individual MTs observed in TIRFm (Figure 3A-C and 3F; S4, movie S1, left top panel). The corresponding simulated kymographs of individual MTs are presented in Figure 3D-E and movie S4.

Then, we simulated the dynamics of MTs bundled by MAP65-1/4. To account for the reduction of depolymerization length of bundled MTs observed *in vitro* (Figure 1E-G), we hypothesize that the MAP bonds between MTs in a bundle act as a brake during MT shrinkage. More precisely, a MT undergoing depolymerization has a probability pR to remove

a connected MAP and to continue its depolymerization; conversely, if a MAP is not removed (with probability $1-pR$), we assume that the MT shrinkage stops immediately (Figure 4A). Basically, for pR close to unity, MT-MT links *via* MAP65s are easily removable and MT depolymerization extension is almost independent of the presence of MAP65-1/4. Conversely, a pR value close to zero indicates that the removal of a MT-MT connection is extremely rare and depolymerization is stopped by the first encounter between the MT end and a MAP. To assign a value to pR , we simulated the MT dynamics in MT bundles for different values of pR and different MT numbers in bundles; other parameters such as the polymerization/depolymerization rates or the catastrophe/rescue frequencies are those determined for single MT (Figure 3F). We reported the difference between the expected maximal lengths of MTs in bundles as predicted by the model and as obtained in *in vitro* experiments over a period of 20 minutes and for both MAP65s (Figure 4D).

For MAP65-4 cross-linked bundles, assuming that MAP65-4 cross-linking is independent of the MT polarity within bundles (Figure 4B), the model predicts that MT bundle lengths are comparable to those observed experimentally for different MAP65-4 concentrations (Figure 4D). In these bundles, we were able to determine the best couple (Number of MTs, pR)=(15, 0.7) to match model output and experimental data (Figure 4E and movie S5). The MAP65-4 induced synchronization of the two rightmost (+)-end trajectories in the simulated kymograph (Figure 4H, left) is consistent with its experimental counterpart (Figure 4G); kymographs in Figure 4H and Figure 3D illustrate the MT steady elongation when bundled by MAP65-4. MAP65-4 linear density is extremely high (Figure 4H right and movie 5) and is sufficient to robustly synchronize MT growth in bundles.

The rationale we used to model the dynamics of MT bundled by MAP65-1 is more complex. If we assume that MAP65-1 connects anti-parallel MTs only, the maximal MT length in the bundle was systematically underestimated by the model (compare left and right columns for MAP65-1, Figure 4D). If MAP65-1 were to connect anti-parallel MTs only and because MTs coupling comes in pairs, the synchronization of MT ends by MAP65-1 would not yield an increase rate of the MT greater than that of the minus end in the pair. This argument alone demonstrates that the assumption of MAP65-1 forming anti-parallel pairs only should be relaxed. In consequence, we introduced the possibility of MAP65-1 bonds between parallel MTs (e.g. MT aligned with their $+/+$ and $-/-$ ends on the same side); the corresponding removal probability is denoted pR_1 (Figure 4C). First, we fixed the number of MTs in the bundle at 10 and we computed the error for different combinations of the couple (pR , pR_1) (Figure 4F). The model predicts that the best fit is obtained for low pR (~ 0.2) and high pR_1

(~0.8) values (Figure 4F, left panel). More interestingly, in large bundles (more than 10 MTs), the value of pR_l is independent of pR (Figure 4F, left panel). When we use the number of MTs and pR_l as varying parameters (for a constant $pR=0.2$, Figure 4F, middle and right panels) we predict MT bundle length consistent with experimental observations (see also Figure S5A-C for a systematic evaluation of the bundle dynamics for different pR in the interval $[0, 0.5]$). This is true for all MAP65-1 concentrations used in model simulations and experiments (Figure S5B). Altogether these data demonstrate that MAP65-1 induced MT bundles contain both parallel and anti-parallel MTs, but MAP65-1 links between parallel MTs are more sensitive to MT depolymerization than those between anti-parallel MTs. Indeed, the predicted kymograph of MAP65-1 cross-linked MTs is similar to the experimental one (Figure 4I and 4J left, movie S3). Moreover, the synchronization between plus ends, which is particularly clear on the right side of the simulated kymograph (Figure 4J, left), is controlled by the presence of MAP65-1 between parallel MTs. Although these bonds can be removed easily, as indicated by the blue isolated segments (Figure 4J, right and movie S3, top right panel), their effect is sufficient to protect parallel MT from large depolymerization. To validate that MAP65-1 has the ability to bundle MTs having the same polarity as predicted by the model, we incubated MTs nucleated from sea urchin axonema with MAP65-1. We observed that all parallel elongating MTs are bundled by MAP65-1 (Fig S5D).

DISCUSSION

In this study, we developed a model to account for the observed MAP65-1/4 induced bundle growth. At first, the model allowed us to correlate the polarity and the dynamic properties of individual cross-linked MTs within a bundle. We confirm the lack of selectivity of MAP65-4 for cross-linking parallel or anti-parallel MTs *in vitro*, this MAP65 being localized with parallel oriented MTs during mitosis. In contrast, the model reveals that MAP65-1, which was previously shown to selectively bind anti-parallel MTs (Gaillard, 2008), is also able to cross-link parallel oriented MTs within bundles. Furthermore, we show that MAP65-1 binding to parallel MTs is relatively weak compare to the strong one determined for anti-parallel MTs, and that a tiny but non-negligible fraction of MAP65-1 connecting parallel MT in a bundle is essential to ensure its sustained growth. The presence of MAP65-1 bonds between parallel MTs in bundles is consistent with previous studies showing that MAP65-1 homologs Ase1 and PRC1 have a strong but not exclusive preference for binding anti-parallel MTs versus parallel MTs (Janson, 2007; Bieling, 2010; Subramanian, 2010). In plant cells, it has been

shown that MAP65-1 associates with cortical MT bundles (Van Damme, 2004), the polarity of MTs within them remaining controversial. Indeed, the polarity of MTs within the overall population of cortical MT bundles has been described to be predominantly anti-parallel (Shaw, 2010) or parallel (Dixit, 2006). However, in these studies the proportion of parallel and anti-parallel MTs within individual bundles was not determined. To ensure sustained bundle growth for all possible ratios of parallel/anti-parallel pairs in the bundle, MAP65-1 should bind a small fraction of parallel MTs (this study). This assumption is fully compatible with published data showing that MAP65-1 cross-links preferentially anti-parallel MTs *in vitro* and *in vivo* during mitosis (i.e. midzone of the spindle, (Gaillard, 2008)). These data suggest that *in vivo*, MAP65-1-induced bundles may contain two populations of MTs: (i) strong bonds between anti-parallel MTs that maintain a robust although dynamic core in the bundle, and (ii) weak bonds between parallel MTs that ensure their synchronized growth. Moreover, cell imaging studies revealed that the cortical MT bundles are generated by shallow-angle encounters of mobile MTs with MT bundles prior to their co-alignment (Shaw, 2003) and that their co-alignment could be established through selective stabilization and enrichment of parallel MTs compared with anti-parallel MTs (Dixit, 2006). First, our model demonstrates that MAP65-1 bonds between anti-parallel MTs lower MT dynamics and are stronger than those generated between parallel MTs. Therefore we conclude that MAP65-1 induced cortical bundles and must contain preferentially anti-parallel MTs although the proportion of parallel MTs vs. anti-parallel in a bundle remains to be determined. Second, our model indicates that the MAP65-1 removal probability is almost independent of the actual number of MTs in the bundle (6-8 MTs). We propose that once this critical number of 6-8 MTs in a bundle is reached, MAP65-1 bundling drives the growth of the bundle as a whole and triggers MT continuous growth. In addition, if the fluctuations in the number of MTs in bundles are large, due to randomness in MTs encounters prior to bundle initial formation, then the presence of MAP65-1 would select and stabilize bundles which reach the critical number first. One can hypothesize comparable mechanisms for MAP65-4 during organizing MT bundles in the mitotic spindle in prophase.

The prediction that MAP65-1 bonds between parallel MTs are more sensitive to MT depolymerization than those connecting anti-parallel ones, suggest that this bond sensitivity is correlated with the structural conformation of MAP65-1 dimers when engaged in parallel/parallel or parallel/anti-parallel bonds. Thus the MT binding domain of MAP65-1 may be stereochemically hindered to interact with parallel and anti-parallel MTs but its conformation and, subsequently, its affinity may be affected by the MT protofilament

orientation. This high affinity of MAP65-1 for anti-parallel MTs compared to the parallel MTs is a property shared with the mammalian ortholog PRC1 (Bieling, 2010). Up to now, only the conformation of the MT binding domain of PRC1 has been resolved and it was shown to adopt different conformations when bound to two anti-parallel MTs or bound to unbundled MTs (Subramanian, 2010). Considering that the MT binding domain of MAP65-1 shares sequence homologies with other MAP65 family members (Hussey, 2002) and that MAP65-1 dimers which cross-link MTs are oriented at an angle of 60° relative to the MT lattice (Gaillard, 2008), this angle being of 70° for PRC1 (Subramanian, 2010), we suggest that the structural basis of MT bundling for MAP65-1 orthologs may be in part conserved. Although the conformation of this domain when cross-linked to parallel MTs has not been reported, we would expect that it adopts a specific conformation upon cross-linking parallel or anti-parallel MTs.

Our *in vitro* reconstitution assay demonstrates that MTs cross-linked by either MAP65-1 or MAP65-4 has reduced dynamics and steady growth. This sustained growth regime results from a reduction of the shrinkage length and the increase of the elongation time, whereas rates of growth and shortening are unaffected. This is in agreement with recent observations of the cortical array where unbundled and bundled MTs by MAP65-1 grow and shrink at the same rate (Shaw, 2010). To account for the bundle continuous growth, our model assumes that MAP65-1/4 acts as a stop limiting MT depolymerization after catastrophe events and that MAP65-1/4 removal is due to the destabilization of the MT lattice, which results from tubulin depolymerization. This assumption is consistent with an extremely stable chemical bond between the MAP65-1/4 and the MT ($k_{off} \sim 0$), (Figure 4K and movies S2, S3). Beside their intrinsic removal probability (parameter pR), the efficiency of the control of MAP65-1/4 on MTs growth in bundles depends also on their linear density along the MTs. Indeed, the number of MAP65-1/4 bound over a length L is ρL where ρ is the linear MAP65s density; in consequence, the probability to sequentially remove ρL MAP65-1/4 is $pR^{\rho L}$. This simple estimate indicates that, even with a high pR close to 1 (i.e. a MAP easy to remove), the high linear density (parameter ρ) is sufficient to limit the depolymerization extension to relatively short L . Furthermore, for bundles generated by MAP65-1, even if the bonds between parallel MTs are more labile than anti-parallel ones, these bonds are essential to ensure steady growth of global bundle dynamics. Molecular mechanisms by which MAP65s are removed are not yet understood. We propose that MT lattice destabilization leads to the disorganization of MAP65 dimers prior to their release as monomers (Fig 5). Indeed, MAP65s behave as

monomers in solution (Gaillard, 2008) and do not interact with tubulin dimers as well (unpublished data). In addition, although the valence of the interaction between MAP65-1/4 monomers and MTs is unknown, we observed no accumulation of MAP65s along individual MTs (Figure 2; Gaillard, 2008).

Another consequence of the limited depolymerization in MAP65-1/4-induced bundles is the synchronization of MT growth so that most of MT ends are close to each other and elongate simultaneously. Because of the MAP65-1/4 accumulation along the MTs, this phenomenon becomes more and more important with bundle age (Figure 1G). *In vivo*, MAP65-1/4 bundle different MT populations during the cell cycle that must have their growth rate controlled. For instance, MAP65-4 being localized with kinetochore fibers during prophase (Fache, 2010), and their formation supporting persistent MT growth in the vicinity of kinetochores (Wollman, 2005). we suggest that MT growth synchronization due to MAP65-4 represent an advantage for MT bundles searching for kinetochores or establishing connections between chromosomes and the spindle poles to organize the acentrosomal mitotic spindle in prometaphase. Moreover, MT synchronized elongation in MAP65-1 induced bundles might globally participate to the control of MT length in the cell cortex. This synchronization would synergize with proteins that stabilize and/or destabilize MT ends, such as +TIPs proteins or depolymerizing kinesins, and would increase their efficiency. Thus, a depolymerizing kinesin, recruited at a plus end of a cross-linked MT in a bundle having mixed polarity, should inhibit the growth of all connected MTs. Therefore, the limitation of the MT growth is propagated to the whole bundle. Such an orchestrating effect of kinesins on the length of bundled MTs has been reported for Ase1 (Janson, 2007) and PRC1 (Bieling, 2010). In this context, it will be of great interest to determine whether plant MAP65s can interact with kinesins to control the length of MTs.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of proteins

Tubulin, MAP65-1 and MAP65-4 from *Arabidopsis thaliana* were purified as already described (Gaillard, 2008; Fache, 2010).

Total Internal Reflexion Fluorescence microscopy assays

Assays were done according to (Fache, 2010). Briefly, stable seed bundles (0.3 μ M MT seeds bundled with 1 μ M MAP65s) were elongated with tubulin (17 μ M of unlabeled tubulin, 5 μ M of Alexa-labeled tubulin) in the presence of various concentrations of MAP65s.

MT nucleation from axonema

Sea urchin axonema (*Strongylocentrotus purpuratus*) spotted on a coverslip were first mixed for 5 min with 10 μ M tubulin at 35°C to initiate MT nucleation and elongation, and then perfused with various concentrations of MAP65-1.

Modeling of MT bundle growth in the presence of MAP65-1 and MAP65-4.

In a first step, we simulated the kinetics of unbundled MTs, including polymerization/depolymerization rates and rescue/catastrophe frequencies to account for the dynamics of MT alone. In a second step, we considered that MAP65s establish bonds between pairs of parallel and/or anti-parallel MTs, thereby modifying the MT bundle growth. Different models for the interactions between either MAP65-1 or MAP65-4 and MT orientation within bundles (parallel or anti-parallel) were studied to account for the average bundle growth observed in TIRF microscopy. Detailed description of the model is available in the supplementary material section.

Acknowledgments

The authors thank Jérémie Gaillard for technical support and Isabelle Arnal for the gift of sea urchin axonema. This work was funded by grants from the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), and the CEA (Commissariat aux Energies Alternatives) and from French research Ministry support to D.P and V.F.

References

- Allard, J.F., Wasteney, G.O., and Cytrynbaum, E.N. (2010). Mechanisms of self-organization of cortical microtubules in plants revealed by computational simulations. *Mol Biol Cell* 21, 278-286.
- Baas, P.W., Karabay, A., and Qiang, L. (2005). Microtubules cut and run. *Trends Cell Biol* 15, 518-524.
- Bartolini, F., and Gundersen, G.G. (2006). Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci* 119, 4155-4163.
- Bieling, P., Telley, I.A., and Surrey, T. (2010). A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps. *Cell* 142, 420-432.

Dixit, R., Chang, E., and Cyr, R. (2006). Establishment of polarity during organization of theacentrosomal plant cortical microtubule array. *Mol Biol Cell* 17, 1298-1305.

Dixit, R., and Cyr, R. (2004). Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modifications of microtubule behavior. *Plant Cell* 16, 3274-3284.

Eren, E.C., Dixit, R., and Gautam, N. (2010). A three-dimensional computer simulation model reveals the mechanisms for self-organization of plant cortical microtubules into oblique arrays. *Mol Biol Cell* 21, 2674-2684.

Fache V, Gaillard J, Van Damme D, Geelen D, Neumann E, Stoppin-Mellet V, Vantard M. (2010). Arabidopsis kinetochore fiber-associated MAP65-4 cross-links microtubules and promotes microtubule bundle elongation. *Plant Cell* 22, 3804-15.

Fu, Y., Xu, T., Zhu, L., Wen, M., and Yang, Z. (2009). A ROP GTPase signaling pathway controls cortical microtubule ordering and cell expansion in Arabidopsis. *Curr Biol* 19, 1827-1832.

Gaillard, J., Neumann, E., Van Damme, D., Stoppin-Mellet, V., Ebel, C., Barbier, E., Geelen, D., and Vantard, M. (2008). Two microtubule-associated proteins of Arabidopsis MAP65s promote antiparallel microtubule bundling. *Mol Biol Cell* 19, 4534-4544.

Glotzer, M. (2009). The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 9-20.

Hussey, P.J., Hawkins, T.J., Igarashi, H., Kaloriti, D., and Smertenko, A. (2002). The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol Biol* 50, 915-924.

Janson, M.E., Loughlin, R., Loiodice, I., Fu, C., Brunner, D., Nedelec, F.J., and Tran, P.T. (2007). Crosslinkers and motors organize dynamic microtubules to form stable bipolar arrays in fission yeast. *Cell* 128, 357-368.

Kawamura, E., and Wasteneys, G.O. (2008). MOR1, the Arabidopsis thaliana homologue of *Xenopus* MAP215, promotes rapid growth and shrinkage, and suppresses the pausing of microtubules in vivo. *J Cell Sci* 121, 4114-4123.

Mao, T., Jin, L., Li, H., Liu, B., and Yuan, M. (2005). Two microtubule-associated proteins of the Arabidopsis MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiol* 138, 654-662.

Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242.

Mollinari, C., Kleman, J.P., Jiang, W., Schoehn, G., Hunter, T., and Margolis, R.L. (2002). PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol* 157, 1175-1186.

Peterman, E.J., and Scholey, J.M. (2009). Mitotic microtubule crosslinkers: insights from mechanistic studies. *Curr Biol* 19, R1089-1094.

Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.

Reilein, A., and Nelson, W.J. (2005). APC is a component of an organizing template for cortical microtubule networks. *Nat Cell Biol* 7, 463-473.

Shaw, S.L., Kamyar, R., and Ehrhardt, D.W. (2003). Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science* 300, 1715-1718.

Shi, X.Q., and Ma, Y.Q. (2010). Understanding phase behavior of plant cell cortex microtubule organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11709-11714.

Smertenko, A.P., Chang, H.Y., Wagner, V., Kaloriti, D., Fenyk, S., Sonobe, S., Lloyd, C., Hauser, M.T., and Hussey, P.J. (2004). The *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell* 16, 2035-2047.

Subramanian, R., Wilson-Kubalek, E.M., Arthur, C.P., Bick, M.J., Campbell, E.A., Darst, S.A., Milligan, R.A., and Kapoor, T.M. (2010). Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein. *Cell* 142, 433-443.

Van Damme, D., Bouget, F.Y., Van Poucke, K., Inze, D., and Geelen, D. (2004a). Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins. *Plant J* 40, 386-398.

Van Damme, D., Van Poucke, K., Boutant, E., Ritzenthaler, C., Inze, D., and Geelen, D. (2004b). In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol* 136, 3956-3967.

Wasteneys, G.O., and Ambrose, J.C. (2009). Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol* 19, 62-71.

Whittington, A.T., Vugrek, O., Wei, K.J., Hasenbein, N.G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M.C., and Wasteneys, G.O. (2001). MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* 411, 610-613.

Supporting Text.

Modeling microtubules (MT) growth in the presence of microtubules associated proteins (MAP).

V Stoppin-Mellet*, V Fache*, D Portran*, JL Martiel*, M Vantard*

* Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA/CNRS/INRA/Université Joseph Fourier, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France|| Corresponding authors: Virginie Stoppin-Mellet and Marylin Vantard, iRTSV/PCV, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France; e-mail: virginie.stoppin-mellet@cea.fr; marylin.vantard@cea.fr; Tel: (33) 4 38 78 32 03; Fax: (33) 4 38 78 50 91.

In section A, we present the kinetic model for the growth and shrinkage phases of isolated MT accounting for growth and shrinkage phases. The kinetic parameters were determined from the analysis of MT dynamics observed with TIRF microscopy in the absence of MAPs. In the section B, we introduce the MAP65-1/4 assuming the binding of parallel or anti-parallel MT in a bundle. We hypothesize that the presence of MAP bonds between MT limits MT shortening phases and synchronizes MT growth. In the third section C, we will present how the model is simulated and compared to experimental results.

A. Kinetics of isolated microtubules.

We assume that microtubules (MT) grown from taxol-stabilized seeds are aligned along an axis with the initial seed centered at the axis origin.

For a single MT, the positions of its plus (+) and minus (-) ends are given by stochastic, time-dependent variables, respectively, $X(+,t)$ and $X(-,t)$. Since the initial orientation of the seed is totally random, the plus (resp. the minus) MT end positions $X(+,t)$ and $X(-,t)$ can positive/negative abscissae along the horizontal axis with the same probability.

To simplify the model further, we use constant growth/shrinkage rates, assuming that the GTP-tubulin dimers concentration in the medium is largely above the critical concentration of the plus/minus MT ends. During growth or shrinking phases, the position of the MT ends changes depending on the polymerization/depolymerization rates associated with the MT end type (plus/minus) according to

$$X(+, t + h) = X(+, t) + hV_+^G, \quad (1)$$

during MT growth and

$$X(+, t + h) = X(+, t) - hV_+^S, \quad (2)$$

during MT shrinkage. Note that Eqs. (1) and (2) are valid if a (+) end is located on the right of the origin; for a MT with the opposite orientation, one has

$$X(+, t + h) = X(+, t) - hV_+^G, \quad (3)$$

$$X(+, t + h) = X(+, t) + hV_+^S. \quad (4)$$

In equations (1-4), t represents the time at which a rescue (resp. catastrophe) event has occurred in the past; in addition, it is implicitly assumed that no catastrophe (resp. rescue) event has occurred in the time interval $[t, t+h]$.

Parameters V_+^G or V_+^S are, respectively, the growth and shrinkage rates of plus ends experimentally determined from TIRFm analysis (Table 1). The case of minus ends movement is treated using the same formalism:

$$X(-, t + h) = X(-, t) - hV_-^G, \quad (5)$$

$$X(-, t + h) = X(-, t) + hV_-^S. \quad (6)$$

for a minus end located on the left of the origin of abscissae. Conversely, a minus end located on the right side of the origin changes its position according to

$$X(-, t + h) = X(-, t) + hV_-^G, \quad (7)$$

$$X(-, t + h) = X(-, t) - hV_-^S. \quad (8)$$

The corresponding growth and shrinkage rates for minus ends are listed in Table 2. The presence of non-hydrolysable GTP associated with the tubulin dimers in the MT seed constraints the plus and minus ends positions to be always on the right (resp. left) of the seed ends. For example, if a MT has its plus end on the right side of the origin and if we denote by X_+^{Seed} (resp. by X_-^{Seed}) the positions of the plus (resp. minus) seed ends, one has, for all time t

$$X(-, t) \leq X_-^{Seed} < 0 < X_+^{Seed} \leq X(+, t). \quad (9)$$

A similar relation holds for MTs with a reverse orientation

$$X(+, t) \leq X_+^{Seed} < 0 < X_-^{Seed} \leq X(-, t). \quad (10)$$

In addition to growth and shrinkage phases, we introduced pauses which start when a shrinkage phase was prematurely ended as the position of the MT (plus/minus) end coincides with that of the seed (plus/minus) end, i.e.

$$X(+, t) = X_+^{Seed} \text{ or } X(-, t) = X_-^{Seed}. \quad (11)$$

Given (i) the average duration of the different phases determined from the experiments (Table 1), (ii) the rates of growth and shrinkage (Table 1) and (iii) the probabilities for transitions between growth, shrinkage or pause phases (Table 2), one can simulate the position of the plus or minus ends by the following algorithm (here the algorithm is presented for the plus end; the algorithm for the minus end has a similar structure). We assume that a MT plus end is

either growing ('G'), shrinking ('S') or pausing ('P'). The dynamics of MT ends is based on the alternation of G, S or P phases whose duration is a random time drawn from exponential distribution of parameters τ_+^G , τ_+^S or τ_+^P . These parameters are the average duration of, respectively, growth (τ_+^G), shrink (τ_+^S) or pause (τ_+^P) phases for a (+) end (see Table 1 for the definition and values of these parameters; the average duration of growth, shrink and pause phases of the (-) ends are, respectively, τ_-^G , τ_-^S or τ_-^P). In addition, we assume that transitions between growth, shrinkage and pause phases are Markovian, i.e. the probability that a particular MT extremity starts a new phase of type $y(t)$ at time t depends only on the state $x(t)$ of that extremity just before the transition. Therefore, a (+/-) MT end is characterized by (i) its phase status ($x(t_0) \in \{G, S, P\}$), where t is the running time and t_0 is the beginning of the phase; one has always $t \geq t_0$ (ii) the duration of the phase ($T_{+/-}^{x(t_0)}$). The simulation algorithm consists into two parts: (i) initialization of the MT state at $t = 0$ and (ii) MT dynamics simulation.

Initialization. At $t = 0$, choose the MT end state among (G, S, P) according to the probability distribution $\left(\frac{\tau_+^G}{A}, \frac{\tau_+^S}{A}, \frac{\tau_+^P}{A}\right)$, with $A = \tau_+^G + \tau_+^S + \tau_+^P$. Once the state $x(0,0)$ is chosen ($x(0) \in \{G, S, P\}$), draw the duration of this state, denoted by $T_+^{x(0)}$, using the exponential distribution of parameter $\tau_+^{x(0)}$. Because the initial time is arbitrary, change the duration of the initial phase into $T_+^{x(0)} \rightarrow \theta T_+^{x(0)}$, where θ is a random number drawn from the uniform distribution over the interval $[0,1]$. In addition, set the velocity of the MT end to $V_+^{x(0)}$ (note that $V_+^P = 0$). The case of minus ends is treated using the same initialization procedure. After initialization, a (+/-) MT end is characterized by a set of four parameters $(t_0, x(t_0), T_{+/-}^{x(t_0)}, V_{+/-}^{x(t_0)})$, namely the beginning of the phase, the status of the phase, the phase duration and the growth/shrinkage rate.

MT dynamics.

1. For all time t such that $t_0 \leq t \leq T_+^{x(t_0)}$, use relations (1-2) or (3-4) to update the MT end position using velocity $V_+^{x(t_0)}$. If the MT plus end position coincides with the seed plus end X_+^{Seed} at some intermediate time point t^* ($t_0 \leq t^* < T_+^{x(t_0)}$), then stop the dynamics and freeze the MT position at X_+^{Seed} until completion of the phase.
2. At the end of the $x(t_0)$ phase, i.e. at time $t_0 + T_+^{x(t_0)}$, use the probabilities transitions listed in Table 2 to determine the next MT end state given that the MT was in state $x(t_0)$ at $t_0 + T_+^{x(t_0)}$. Once the new MT end state is chosen (this state is denoted $x(t_0 + T_+^{x(t_0)})$), draw its duration from the exponential distribution of parameter $\tau_+^{x(t_0 + T_+^{x(t_0)})}$; change the velocity to $V_+^{x(t_0 + T_+^{x(t_0)})}$.

3. Update time, the set of MT parameters according to :

$$t_0 \rightarrow t_0 + T_+^{x(t_0)}, \quad x(t_0) \rightarrow x(t_0 + T_+^{x(t_0)}), \quad T_+^{x(t_0)} \rightarrow T_+^{x(t_0) + T_+^{x(t_0)}}, \quad V_+^{x(t_0)} \rightarrow V_+^{x(t_0) + T_+^{x(t_0)}}.$$

Then, go back to step 1.

The case of minus ends is treated using the same algorithm.

B. MAPs bonding and the control of MT kinetics.

In section A, we presented the algorithm for the dynamics of isolated MT grown from stable seeds. In this section, we consider bundles of MT, with random orientation (i.e. the MT in the bundles can form parallel or anti-parallel MT pairs, with the same probability). The two MAPs under consideration (MAP65-1 and MAP65-4) are known to have different mechanism for MTs bonding and sensitive to the relative MT orientation in a pair (i.e. parallel or anti-parallel MTs). MAP64-4 is indifferent to the MT paring whereas MAP65-1 is reported to connect anti-parallel MTs only.

However, the dynamics of MTs bundles in the presence of MAP65-1 is best understood if we relax this constraint and allow bonding between parallel MTs (see the main text for a discussion of this assumption and its consequences for the MT dynamics).

B1. MAPs binding modeling.

Assuming that the MT are regularly arrayed with their positions located on the vertices of a hexagonal lattice (which is equivalent to assume maximal compactness in the bundle), we determine the number of possible pairs between adjacent MTs in the bundle. Let i and j be the indexes of two MTs in a pair. From the positions of the plus/minus ends of MT i and j , MAPs can connect the two MTs in the spatial domain $[X(i, j, 1), X(i, j, 2)]$ defined by

$$\max(X_j(-, t), X_i(-, t)) = X(i, j, 1) < 0, \quad (12)$$

$$0 < X(i, j, 2) = \min(X_j(+, t), X_i(+, t)), \quad (13)$$

so that

$$X_i(-, t) \leq X(i, j, 1) < X(i, j, 2) \leq X_i(+, t), \quad (14)$$

and

$$X_j(-, t) \leq X(i, j, 1) < X(i, j, 2) \leq X_j(+, t). \quad (15).$$

Note that equations (12-15) implicitly assume that the plus (resp. minus) ends have positive (resp. negative) abscissas; otherwise, relations (11-12) should be changed accordingly.

Therefore, the number of bound MAPs is determined as a binding reaction on a linear lattice with N_{sites} and controlled by the on/off parameters defined in Table 3. The dynamics of MAP binding on anti-parallel MTs obeys similar equations, using appropriate on/off binding rates and linear MAP density (see Table 3).

The presence of MAPs does not change the kinetic parameters (growth/shrinkage rates; duration of growth and shrinkage phases). Therefore, MTs undergo growth/shrinkage dynamics at their ends as if they were isolated. If the MT dynamics in the pair (i,j) is associated with an increase of $X(i,j,2) - X(i,j,1)$, the number of available sites for MAPs binding is increased and a wave of bound maps follows the growing MT ends. Conversely, if the MT dynamics results in a reduction of the spatial domain $[X(i,j,1), X(i,j,2)]$, one should consider explicitly the interactions between shrinking ends and bound maps. This is the object of the next section.

B2. Control of MT dynamics by MAPs.

We assume that MT (j) is undergoing shrinkage and that the position of its plus (+) end, denoted by $X_j(+, t)$, is approaching $X(i,j,1)$; in the meantime, the MT (i) is either pausing or elongating. If the position of the (+) end of MT (j) , $X_j(+, t)$, reaches a MAP position, we assume that the piece of MT (see graphical abstract) bound to the MAP and the MAP itself is removed with a probability pR or stays in place with a probability $1 - pR$ (see Table 2 for the definition of these probabilities). If the MAP is removed, shrinkage can continue until a new MAP is encountered; otherwise, the shrinkage phase is ended prematurely. Note that pR does not represent the probability of unbinding the Map from the MT (an event under the control of k_{off} , Table 1) but the possibility that a piece of the MT (one of more protofilament fragment, see graphical abstract) can be removed with the MAP itself during depolymerization.

The extent of the MT shrinkage is limited either (1) if the pR is extremely low (close to zero) or (2) if the MAP density is very high. On one hand, low pR favors MAPs resisting MT shrinkage. On the other hand, high MAP density increases the number of MAP removals and the premature end of the MT shrinkage. Since each of these events has a probability pR to remove the MAP, the probability to observe N successive removals over a MT length of L is $P(N, L) = (pR)^{L\rho}$, where ρ is the map linear density and $N = L\rho$. Therefore, if ρ is large, $P(N, L)$ is close to zero.

Variable	Definition	Units	
t	time	s.	
$X(+, t)$	Position of the plus end at time t	μm	
$X(-, t)$	Position of the minus end at time t	μm	
$T_{+,-}^G$	Growth duration (plus/minus MT ends)	s.	
$T_{+,-}^S$	Shrinkage duration (plus/minus MT ends)	s.	
$T_{+,-}^P$	Pause duration (plus/minus MT ends)	s.	
$X_{+,-}^{Seed}$	Position of the plus/minus seed end	μm	
Parameter	Definition	Units	Value (cf. Figure 3F)
V_+^G	Growth rate at the (+) end	$\mu\text{m.s}^{-1}$	2.6×10^{-2}
V_-^G	Growth rate at the (-) end	$\mu\text{m.s}^{-1}$	8.8×10^{-3}
V_+^S	Shrinkage rate at the (+) end	$\mu\text{m.s}^{-1}$	2.4×10^{-1}
V_-^S	Shrinkage rate at the (-) end	$\mu\text{m.s}^{-1}$	6.7×10^{-1}
τ_+^G	Average growth phase duration, (+) end.	s.	210
τ_+^S	Average shrinkage phase duration, (+) end.	s.	28
τ_+^P	Average pause phase duration, (+) end.	s.	0
τ_-^G	Average growth phase duration, (-) end.	s.	280
τ_-^S	Average shrinkage phase duration, (-) end.	s.	15
τ_-^P	Average pause phase duration, (-) end.	s.	110

Table 1. List of variables and parameters used in the model for MT kinetics dynamics.

	G	S	P	After the transition
G	G→G	G→S	G→P	
S	S→G	S→S	S→P	
P	P→G	P→S	P→P	

Before
transition

$$P_- = \begin{pmatrix} 0 & 0.946 & 0.054 \\ 0.783 & 0 & 0.216 \\ 1 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \quad P_+ = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 0.449 & 0 & 0.551 \\ 1 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Table 2. Matrix Transition. The letters G, S, P, indicate, respectively, the status of the MT end before (left column) and after (top row) the transition. The intersection of a row and a column gives the probability to make a transition between two MT states as indicated on the top row. Left and right matrixes (bottom row) give the value used in simulation for, respectively, the (-) and the (+) end.

Parameter	Definition	Unit	Value
[MAP]	MAP concentration	μM	$0.1 \leq [\text{MAP}] \leq 1.25$
nMT	Number of MTs in a bundle	-	$2 \leq \text{nM} \leq 15$
k_{on}	MAP65-1/4 binding constant, parallel MTs case.	$\mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$	10^{-2}
k_{off}	MAP65-1/4 dissociation constant	s^{-1}	0
λ	Maximal MAP linear density	μm^{-1}	100
pR	Probability to remove a MAP during shrinkage (MAP65-4 between parallel and anti-parallel MTs; MAP65-1 between anti-parallel MTs).	-	$0 \leq pR \leq 1$
pR_1	Probability to remove a MAP65-1 during shrinkage (parallel MTs only)	-	$0 \leq pR_1 \leq 1$

Table 3. List of parameters used in interactions between MAPs and MTs.

FIGURES

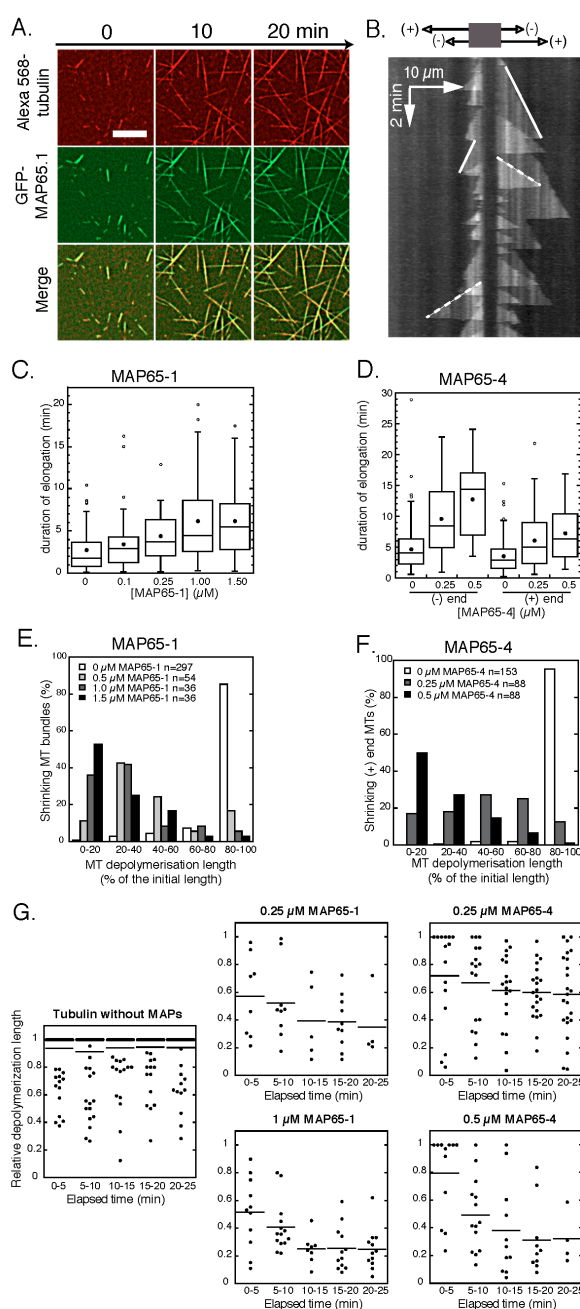


Figure1. Effects of MAP65-1 and MAP65-4 on MT dynamics. (A) Elongation of MTs (22 μ M tubulin) from MT seed bundles in the presence of GFP-MAP65-1 (1 μ M). (B) Kymograph of a MT bundle: solid (dotted) lines correspond to MT minus (plus) ends. (C-D) Increase of the duration of MT elongation after a rescue event in the presence of MAP65-1 (C) and MAP65-4 (D). (E-F) Decrease of MT depolymerization length after a catastrophe event in the presence of MAP65-1 (E) or MAP65-4 (F). (G) Relative MT depolymerization extend over time without MAP65s (left panel) or with MAP65-1 (middle panels) and MAP65-4 (right panels).

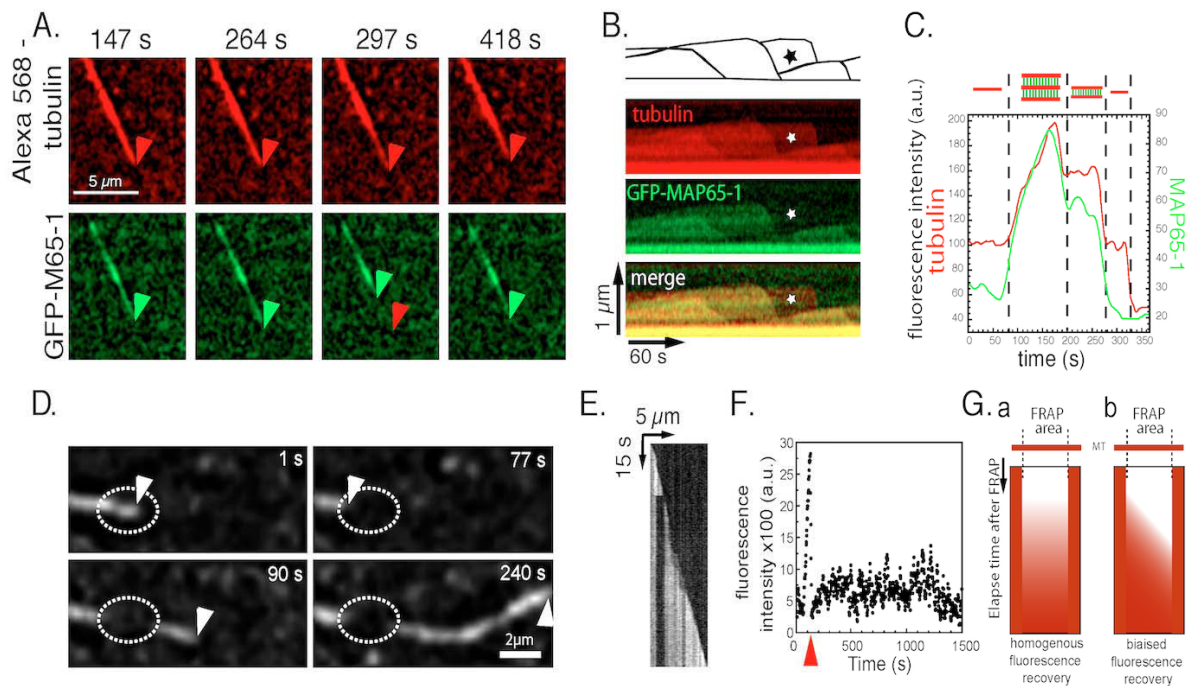


Figure 2. Dynamics of MAP65-1 to MTs. (A). Elongation of the end of a MAP65-1 induced bundle. Arrowheads indicated the end of the Alexa-568 labeled MTs (top row) and the GFP-MAP65-1 labeled MT (lower row). Note that at $t=297s$, the end of the MT bundle is free of GFP-MAP65-1. (B). Kymograph of the MT bundle shown in (A). An elongating MT end (star in the cartoon) is visible in the red tubulin channel (top row), but not in the green MAP65-1 channel (middle row). (C). Linescans of the end of the elongating MTs shown in (A), in the tubulin channel (red trace) and MAP65-1 channel (green trace). We interpret the step-like decrease of tubulin fluorescence intensity as the successive depolymerization of a MT triggered by the loss of MAP65-1. The cartoon shown on top of the graph depicts the number of MTs present in each step, where red and green bars represent MTs and MAP65-1 respectively. (D) FRAP (dotted circle) of GFP-MAP65-1 at the end of an elongating MT bundle (arrowhead). (E) Kymograph of the bundle shown in (D). (F) Level of fluorescence in the bleached zone of the MT over time. Arrowheads indicate FRAP event. (G) Cartoon of a kymograph of a bleached bundle illustrating that fluorescence recovers either through homogenous binding of MAP65-1 (a) or due to elongating MT crossing the bleach zone (b).

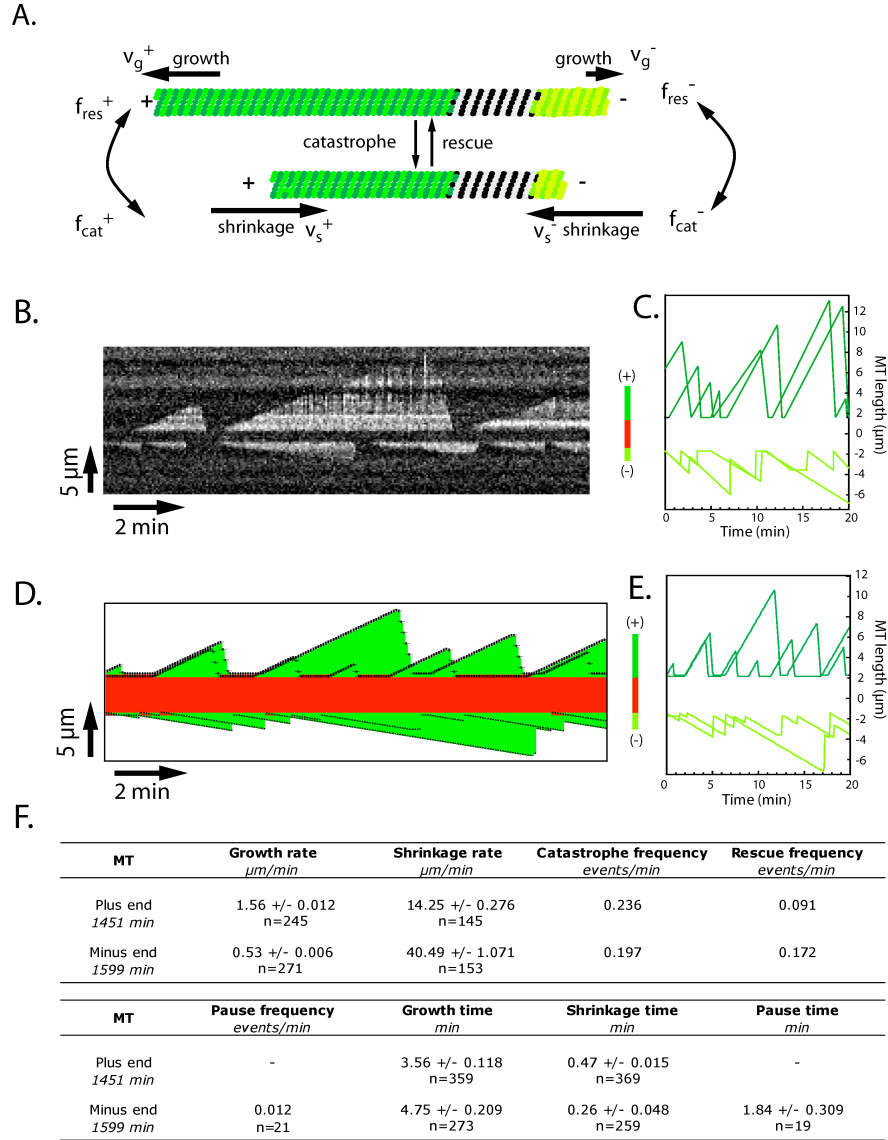


Figure 3. Dynamics of individual MTs. (A) MT seeds are in grey, MT plus ends are in dark green and MT minus ends are in light green. The different parameters of MT dynamics are (i) growth rates at plus/minus ends (V_g^+/V_g^-), (ii) shrinkage rates (V_s^+/V_s^-), (iii) catastrophe/rescue frequencies at MT plus ends (f_{res}^+/f_{cat}^+) and minus ends (f_{cat}^-/f_{res}^-). (B) Observed kymograph of an individual MT fluctuating away from the seed (dark band at the kymograph center). (C) History plot of the fluctuations of two observed individual MTs. Dark and light green traces correspond, respectively, to MT plus and minus ends. (D) Simulated dynamics of two independent MTs (green) elongating from a seed (red). (E) Corresponding fluctuation plots over time (same code color as in C). (F) Experimental values used to simulate the dynamics of individual MTs, as shown in D and E.

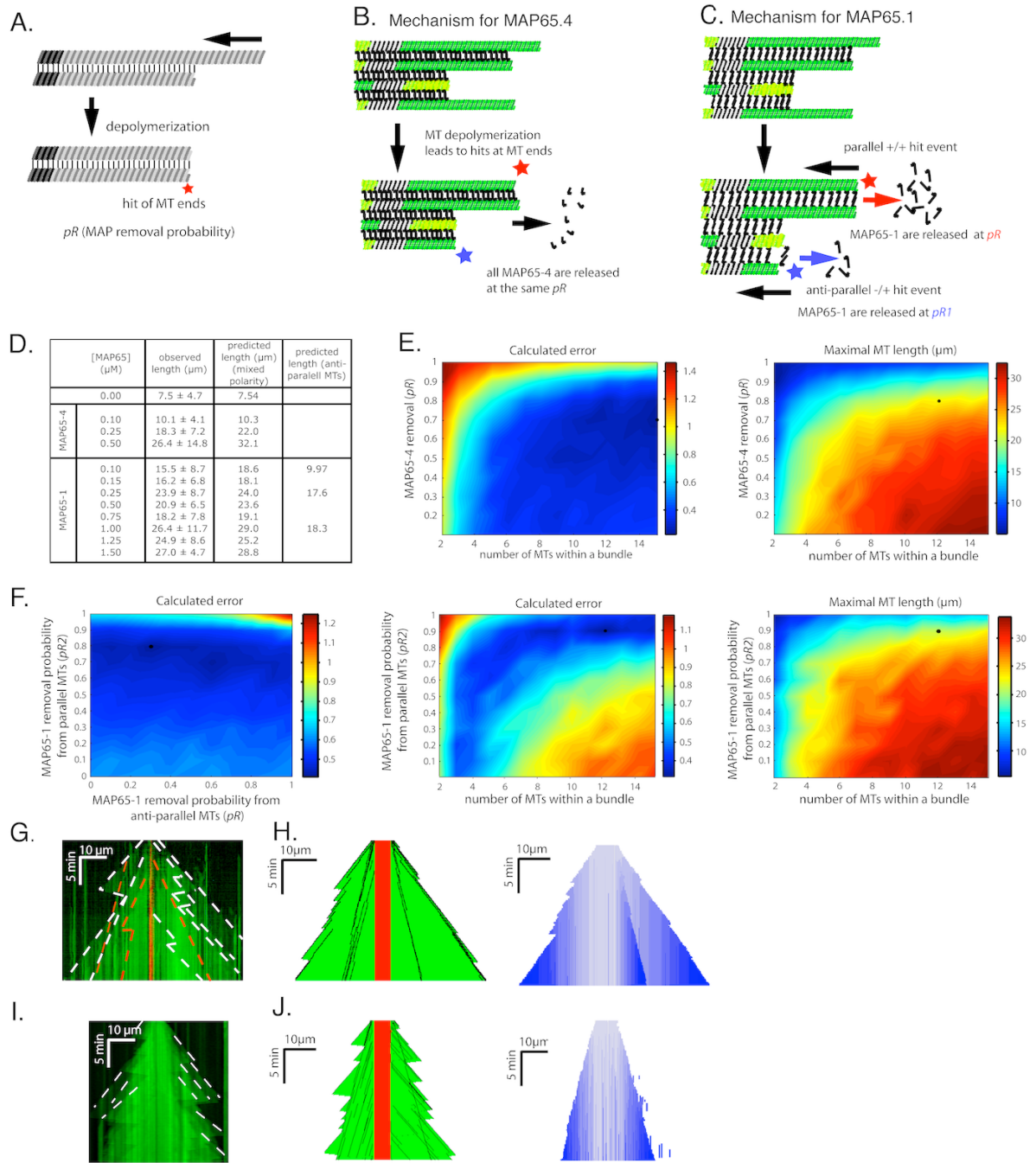
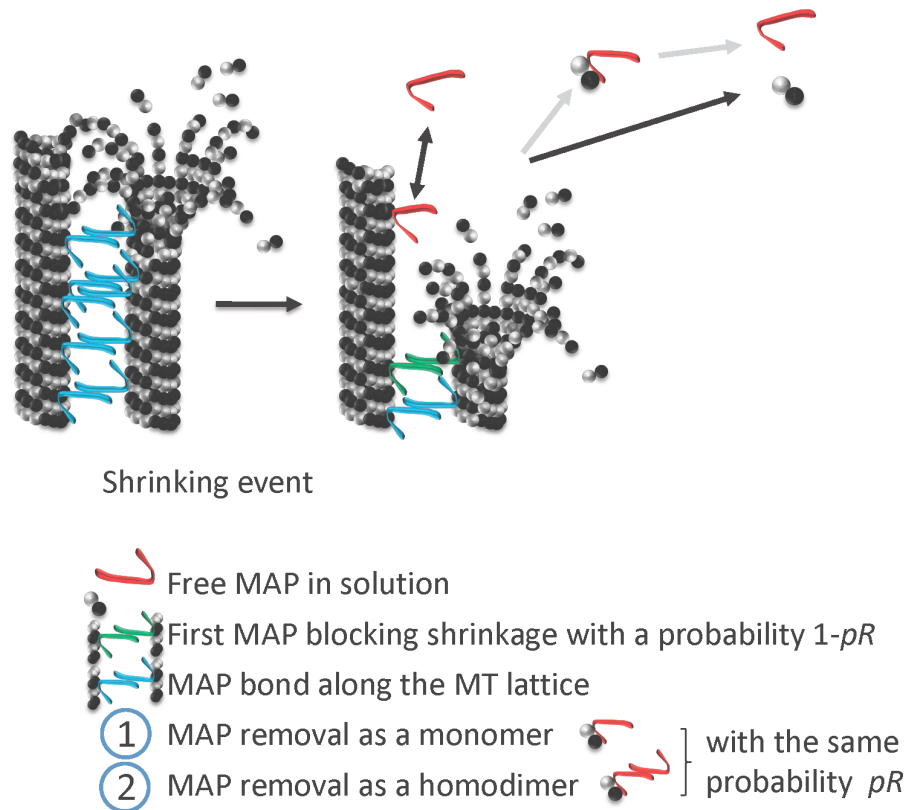


Figure 4. Control of MT dynamics by MAP65s. (A) Rationale used to model MT dynamics in the presence of MAP65s behavior. MT seeds are in dark, dynamic MTs are in grey. MT depolymerization following a catastrophe event is slowed down/stopped by the presence of MAP bonds between MTs. When a shrinking MT end hits a MAP (red star), the left/right most MAPs connecting that MT to any other MT in the bundle has a probability pR to be removed. When two MT ends hit during depolymerization (star), MAP65s at the extremities of the MTs may be removed at pR probability. (B) In MAP65-4-stabilized MT bundles, MAP65-4 detaches from both parallel and anti-parallel MTs with the same pR probability. Plus and minus MT ends are, respectively, in dark and light green. MT seeds are in grey. Red

and purple stars indicate, respectively, parallel and anti-parallel MT encounters of shrinking MT ends with MAPs. (C) In MAP65-1-stabilized bundles, the probability for a MAP65-1 to detach during an encounter with a shrinking MT ends depends on the bond connecting the MT to its neighbors. MAPs between anti-parallel MT detaches with a probability pR (purple star and arrow) and between parallel MTs with a probability pR_l (red star and arrow). MT code colors are the same than in (B). (D) Table comparing the observed (left column) and predicted (middle column) MT maximal length. The right most column gives the predicted MT maximal length in MAP65-1-stabilized bundles assuming connection between anti-parallel MTs only. One can observe that the calculated maximal length is systematically underestimated. (E) Error diagrams between simulated and observed maximal bundle length for different combinations of the number of MTs in the bundle (horizontal axis) and removal probability pR (vertical axis) for all available MAP65-4 concentrations. The error as coded by the color bar on the right, presents a marked minimum for a number of MTs above 10 MTs/bundle and a removal probability pR about 0.8 (E, left panel). Maximal bundle length as predicted by the model is reported at $t=20$ min. (E, right panel). (F) Diagram of the differences between simulated and observed MAP65-1-stabilized bundle for different combination of the removal probability between anti-parallel MTs pR (horizontal axis) and parallel MTs pR_l (vertical axis); we used all available MAP65-1 concentrations and the number of MTs in the bundle was fixed at 12. Middle panel. Phase diagram error calculated for different combinations of the number of MTs (horizontal axis) and removal probability of MAPs connecting parallel MTs pR_l (vertical axis). We used MAP65-1 concentrations in the range from 0.1 to 0.5 μM and the removal probability of MAPs connecting anti-parallel MTs pR was taken in the interval $[0, 0.5]$. Right panel. Maximal bundle length for different combinations of the MT number in the bundle and removal probabilities of MAPs connecting parallel MTs pR_l . The diagram was obtained using a MAP65-1 concentration of 0.5 μM and a removal probability of MAPs between anti-parallel MTs pR in the range $[0, 0.5]$. (G) Experimental kymograph of MTs bundled in the presence of 0.25 μM MAP65-4. White and red dotted lines indicate MT plus and minus ends respectively. (H). Simulated kymograph of MTs in the same conditions as in (G). MT elongation (left subpanel) and MAP65-4 binding (right subpanel) are also shown. The blue color represents the MAP binding wave as the MT elongation progresses. (I) Experimental kymograph of MTs bundled in the presence of 1 μM MAP65-1. As in (G), white dotted lines indicate plus end elongating MTs (note that minus ends are buried in the kymograph). (J) Simulated kymograph of MTs in the conditions of

panel (I) showing MT elongation (left subpanel) and MAP65-1 (right panel). The codes color for panels I and J are given in panels G and H.



Legends schema hypothese

Schematic representation of proposed mechanisms for MAP65s removal during MT depolymerization. MAP65s binds to MT as monomers that bundles MT through their homodimerization when adjacent MTs encounter (right). MT shrinking event leads to tubulin dimers removal and subsequently the disorganization of MAP65-1/4 dimers which are released from the MT lattice by sequential steps (left): 1) both MAP65-1/4 monomers are detached from tubulin dimers or 2) the MAP65-1/4 monomer which is bound to the non shrinking adjacent MT remains transiently bound.

Supplementary figures.

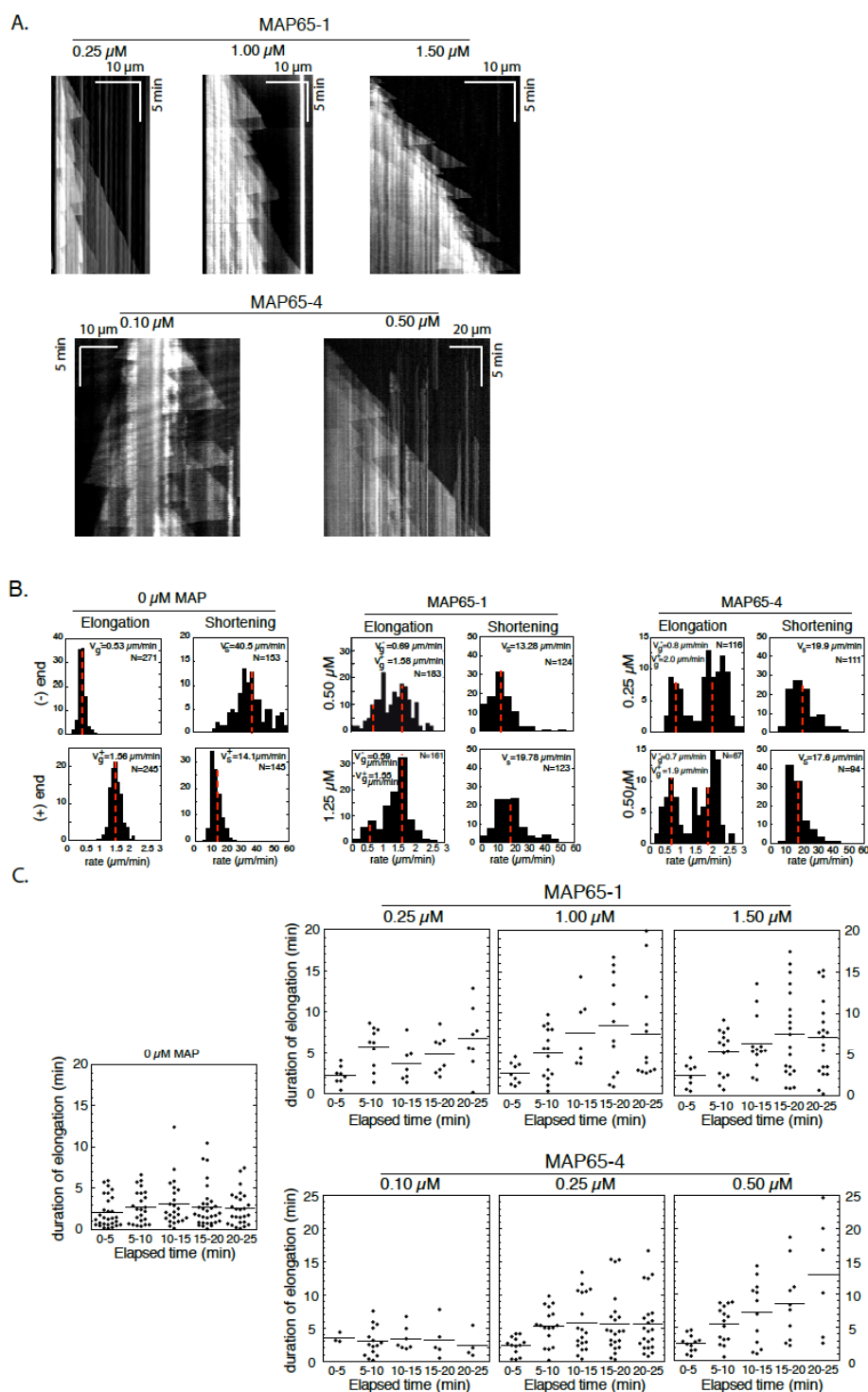


Figure S1. Dynamics of MTs bundled with MAP65-1/4 (A). Kymographs of MT bundled with MAP65-1 (top row) and MAP65-4 (lower row). (B) Distribution of MT growth and shortening rates for both MT ends of individual MTs (left panel) or within bundles in the presence of MAP65-1 (middle panel) or MAP65-4 (right panel). Note that MT bundled by MAP65-1, MT minus ends are often embedded in dense kymographs and, therefore, are

underrepresented in the statistical data used in the analysis. In consequence, reported shortening rates correspond mainly to MT plus ends. Dotted red lines indicates average rates. (C). Duration of MT elongation phases over time without MAPs (left panel), with MAP65-1 (top row, 3 panels) and MAP65-4 (bottom row, 3 panels). In the absence of MAPs, the duration of MT elongation is constant, whereas in the presence of MAP65s, MTs elongate for longer periods.

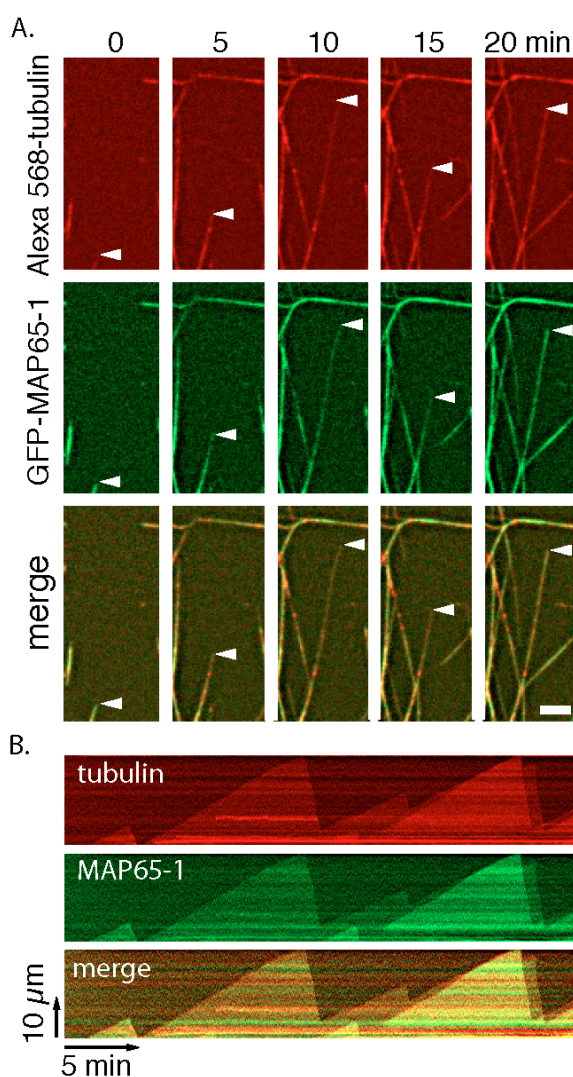


Figure S2. Concomitant binding of MAP65-1 to MTs with MT elongation (A). Time-lapse of an elongating bundle (arrowhead) simultaneously observed in the red Alexa 568-tubulin channel (top row) and green GFP-MAP65-1 channel (middle row). Lower row is the merged image. (B) Kymographs of the elongating MT bundle shown in (A).

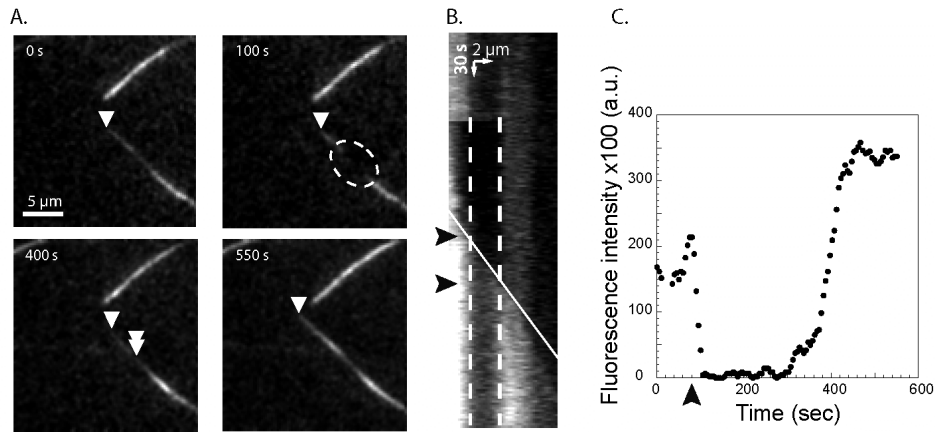


Figure S3. FRAP of GFP-MAP65-1 on MTs (A). Photo-bleaching (dotted circle) of GFP-MAP65-1 of an elongating MT bundle (arrowhead). Fluorescence recovery is observed when a new MT (double arrowhead) crosses the bleached zone. (B) Kymograph of the MT bundle shown in (A). Arrowheads indicate entrance and exit of a new MT that elongates into the bleached zone (indicated by the dotted lines). (C) Level of fluorescence in the bleached zone. Arrowhead indicates the photo-bleaching event. Fluorescence intensity in the bleached zone increases as a new, non photo-bleached MT travels through it.

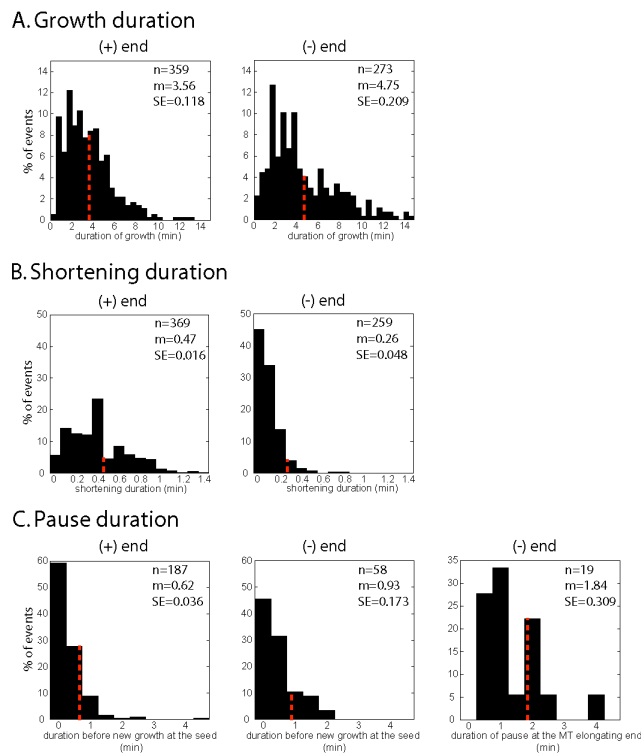


Figure S4. Experimental values for tubulin dynamics in the absence of MAP65s. These values are given in Figure 3 (F) and used to model MT dynamics in Figure 3 (D, E).

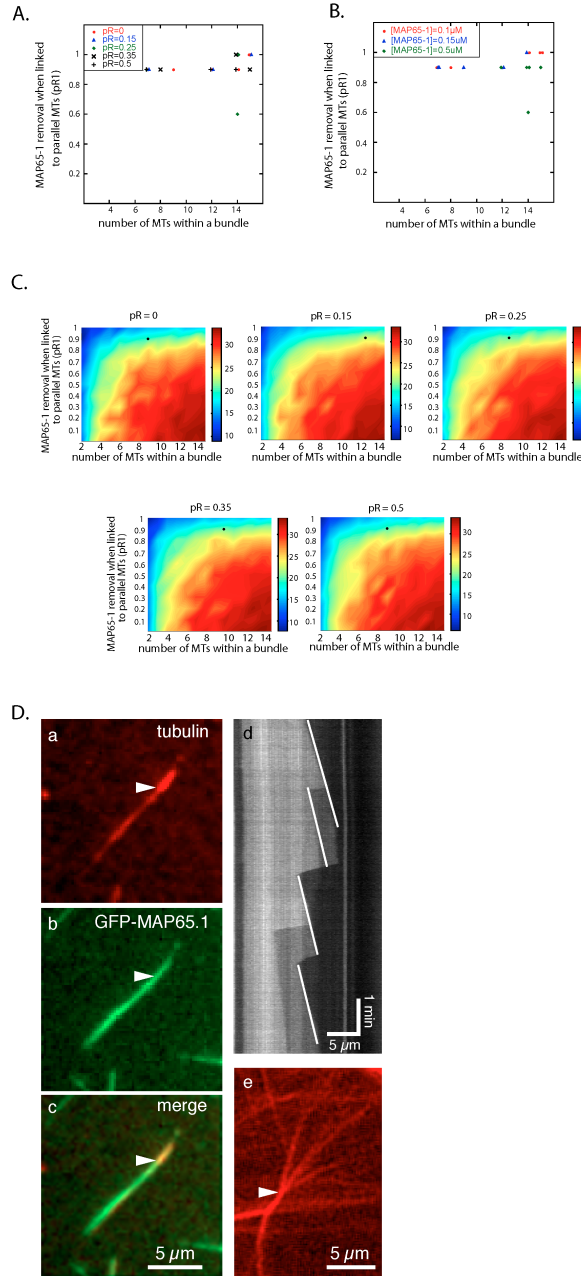
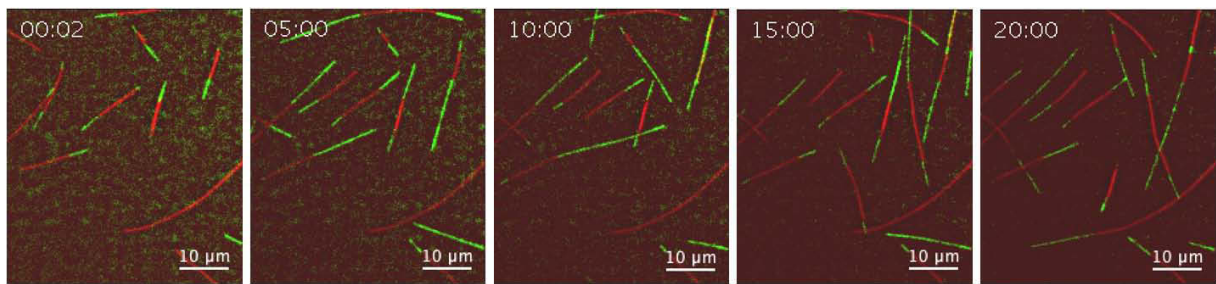
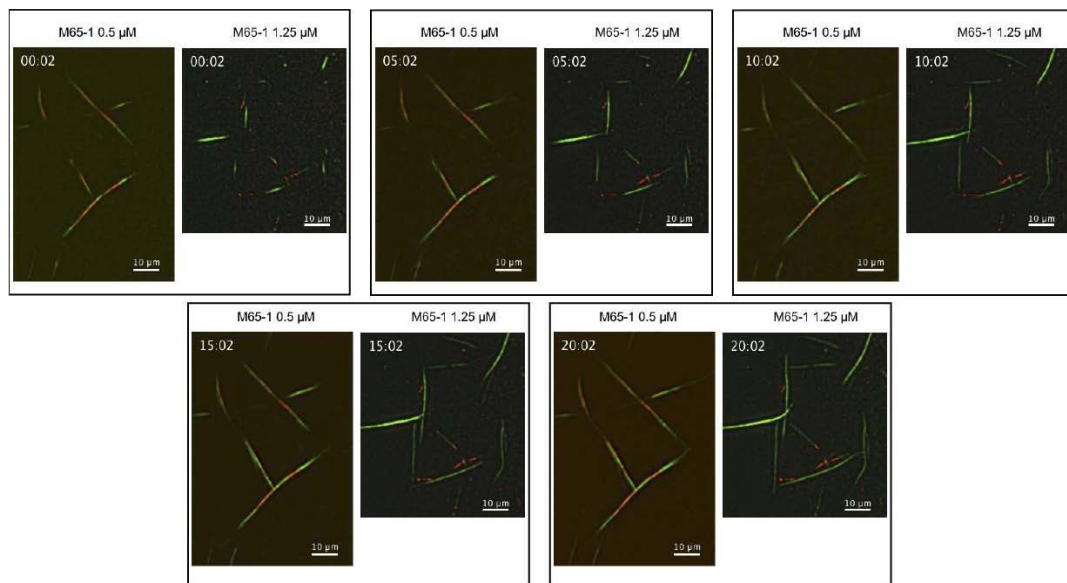


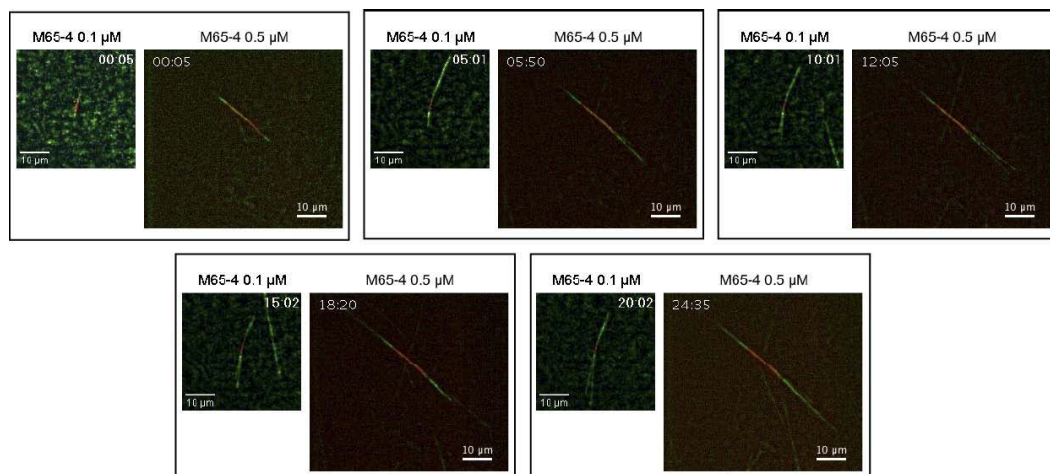
Figure S5. Binding of MAP65-1 to parallel MTs. Optimal removal probability for MAP65-1 connecting parallel MTs (pR_l) as a function of the number of MTs in the bundle. We determined these values for different removal probability for MAP65-1 connecting parallel MTs (pR) (A) or various MAP65-1 concentrations (B). Both panels show that pR_l is in the range 0.9-1 and is independent of the of pR and MAP65-1 concentration. (C). Examples of calculated MT maximal length expressed as a function of pR_l and the number of MTs. Simulations were repeated for different values of pR and for a MAP65-1 concentration of 0.5 μM . (D). Binding of MAP65-1 (b) to parallel MTs (c) nucleated by axonema (arrowhead). (d) Kymograph of a MT bundle as in (b). All MTs have comparable elongation rates, showing that they are parallel. (e) MTs nucleated from an axonema in the absence of MAP65-1.



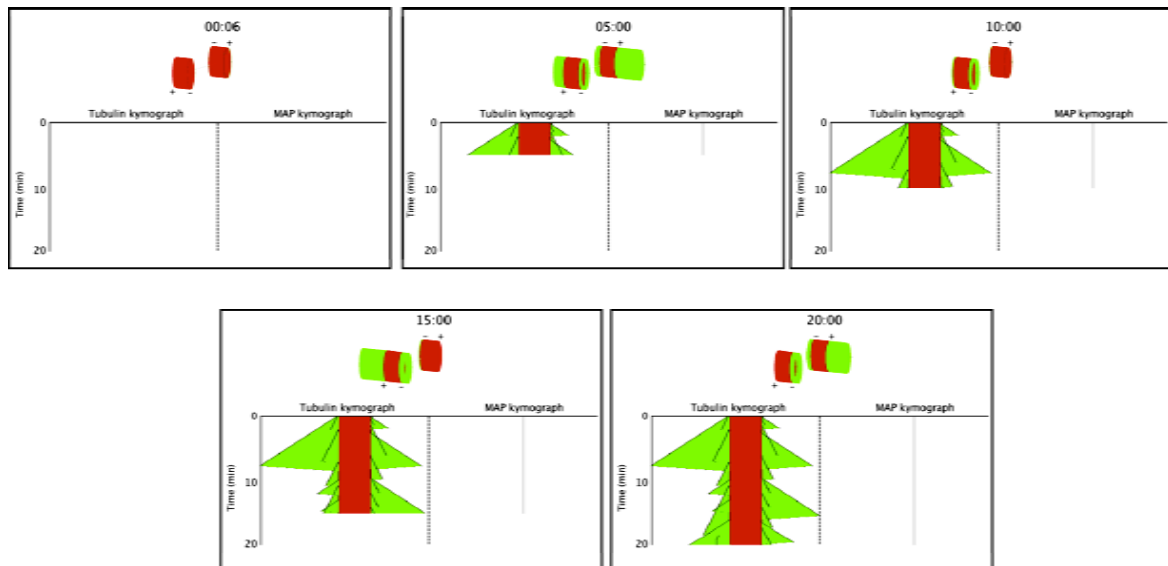
Movie S1. Movies of elongating MTs in the absence of MAP65s (0.2 fps).



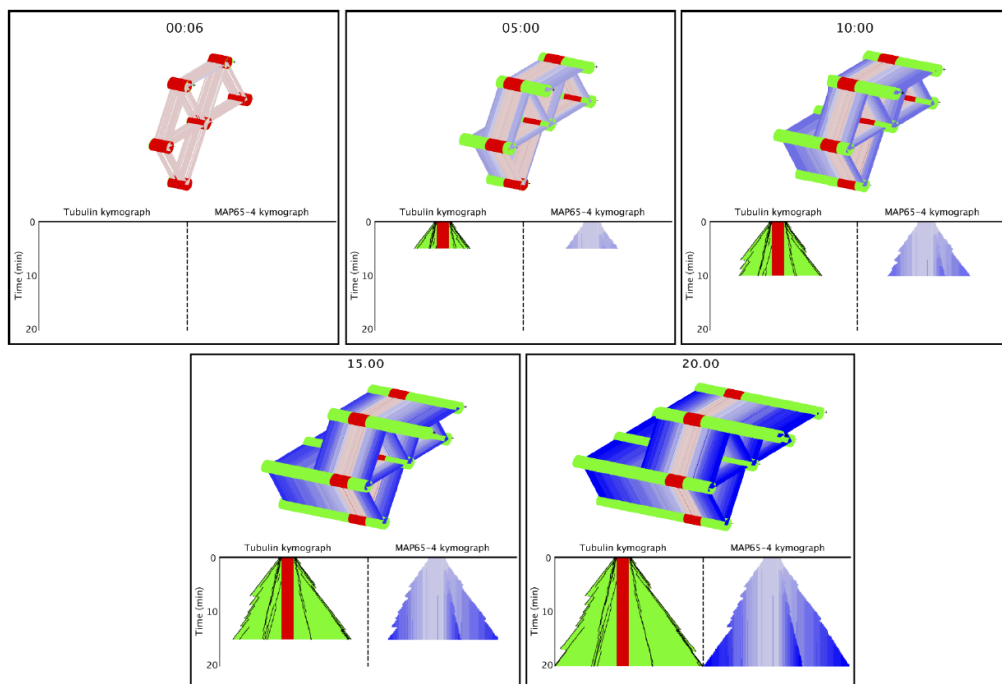
Movie S2. Movies of elongating MT bundles in the presence of MAP65-1 (0.5 fps).



Movie S3. Movies of elongating MT bundles in the presence of MAP65-4 (0.2 fps).

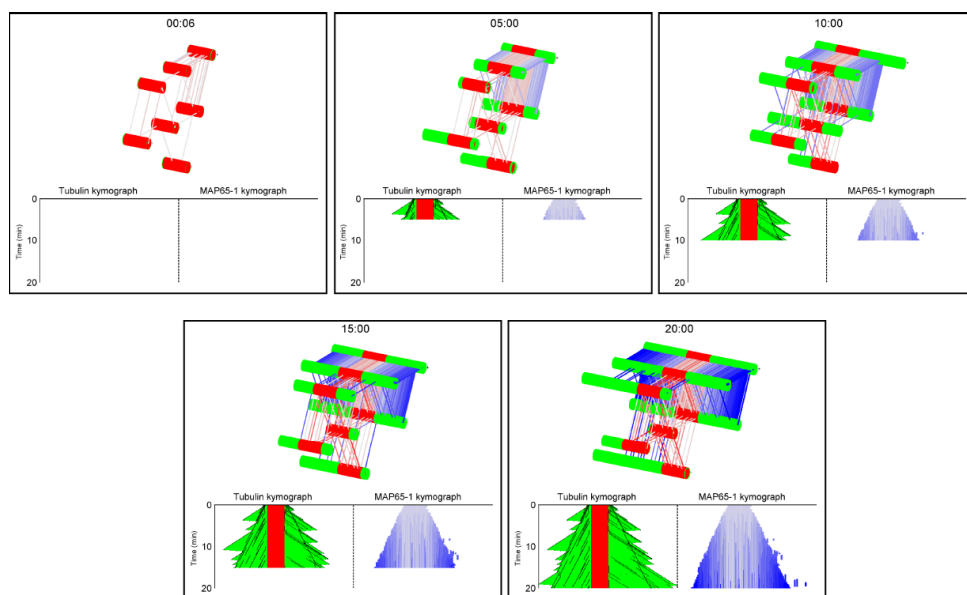


Movie S4. Simulations of MT dynamics in the absence of MAP65s (0.1 fps). Top panel shows dynamic MTs undergoing rescues and catastrophes. MT seeds are in red, tubulin is in green; (+) and (-) indicate plus and minus MT ends respectively. Bottom. Kymographs of tubulin (left, green traces) are shown.



Movie S5. Simulations of MT dynamics in the presence of 0.25 μM MAP65-4 (0.1 fps). Top panel illustrates MTs dynamics and the control of depolymerization by MAP65-4. MT seeds are in red, tubulin is in green. MAP65-4 bonds are symbolized by blue lines connecting the MTs. (+) and (-) indicate plus and minus MT ends respectively. On the bottom of the figure, kymographs of tubulin (left, green traces) and MAP65-4 (right, blue traces) are shown. The

MAP binding wave is coded by the intensity of the blue color used to represents bonds (Top panel) or MAP kymographs (bottom right panel).



Movie S6. Simulations of MT dynamics in the presence of 1 μ M MAP65-1 (0.1 fps). On top are shown dynamic MTs that undergo rescues and catastrophes. MT seeds are in red, tubulin is in green. MAP65-1 bounds are shown in blue. (+) and (-) indicate plus and minus MT ends respectively. On the bottom of the figure, kymographs of tubulin (left, green traces) and MAP65-1 (right, blue traces) are shown. Same code color for the MAP binding wave as in Movie S6.

3. Conclusion et perspectives

La création d'un modèle mathématique modélisant l'activité d'*AtMAP65-4* et *AtMAP65-1* a permis d'identifier des propriétés *in vitro* de ces protéines non observables par l'expérimentation. Ainsi, nos données montrent que les deux protéines *AtMAP65-1* et *AtMAP65-4* agissent comme des stoppeurs qui limitent la propagation des événements de dépolymérisation. Ainsi, lorsqu'un MT atteint une MAP lors d'une dépolymérisation, la MAP a une probabilité pR de se détacher et de laisser la dépolymérisation se poursuivre. Dans le cas contraire, suivant une probabilité de $1-pR$ le processus de dépolymérisation est stoppé par la MAP. Du fait de la densité importante des *AtMAP65s* le long des MTs en faisceaux, les événements de dépolymérisation sont stoppés rapidement. Les MAP étudiées diminuent donc la longueur de MT dépolymérisée. Bien que dans le modèle les probabilités de détachement des MAPs sont élevées, seules quelques unes sont suffisantes pour permettre une croissance persistante des MTs dans les faisceaux. Par ailleurs, le modèle confirme les différences d'activités déjà observées expérimentalement et décrit le mode de fonctionnement des MAPs. *AtMAP65-4* lie les MTs de polarités aléatoires, la longueur des faisceaux générés s'explique par une synchronisation de la polymérisation des extrémités (+). Alors qu'*AtMAP65-1* se lie préférentiellement aux MTs anti-parallèles, la faible proportion de liaison entre MTs parallèles est déterminante dans la croissance synchronisée du faisceau. En effet, une liaison stricte avec des MTs antiparallèles ne permet pas de rendre compte de la longueur des faisceaux observée expérimentalement : les faisceaux alors modélisés sont trop courts.

A l'avenir, il sera important de compléter les informations obtenues jusqu'ici sur les paramètres biochimiques d'*AtMAP65-1* et d'*AtMAP65-4* avec des valeurs expérimentales du K_d , k_{on} et k_{off} . De plus, une étude en cryomicroscopie pourrait permettre d'obtenir des informations quantitatives sur le mode de liaison des MAPs à la surface des MTs (densité, site de fixation sur les dimères de tubulines, espacement entre les MTs). Le modèle n'en sera que plus fiable et de nouvelles variables pourront venir le compléter pour déterminer les propriétés de ces MAPs sur l'auto organisation des MTs *in vitro* ou permettre de tester des hypothèses quant à leur rôle *in vivo*. Un des défis consistera à complexifier le modèle en ajoutant des protéines partenaires qui pourraient moduler le comportement des MAPs. En effet, nous supposons qu'*in vivo*, les *AtMAP65s* agissent en partenariat avec des moteurs moléculaires (kinésines) ou des protéines régulatrices de leur activité (Auroras).

Conclusion perspectives

Les études menées sur les MAPs, et plus particulièrement les MAP65s, démontrent leurs implications dans différents processus cellulaires (morphogenèse, trafic intra cellulaire, division cellulaire, etc). Les données rassemblées font état d'une grande diversité de MAPs, agissant seules ou en présence de partenaires (moteur moléculaire, protéine de bout (+) ...). L'activité des différentes MAPs a été observée en des sites précis au sein de la cellule et à des étapes données du cycle cellulaire. Ce déterminisme est à l'origine de la diversité de l'architecture des réseaux de MTs observés et des multiples fonctions qui leur sont associés. Dans le cas précis des *At*MAP65s, les principales avancées obtenues au cours des dernières années concernent la caractérisation de l'activité *in vitro* de certains de ces membres. En effet, la combinaison de techniques de biochimie, de microscopie à épifluorescence et de microscopie électronique a permis de décrire l'activité principale de trois membres de cette famille à savoir la formation de faisceaux de MTs. De plus, l'utilisation récente de techniques telles que la microscopie à onde évanescente ou la super résolution constituera une avancée majeure qui permettra d'étudier les propriétés dynamiques des MAPs, à l'échelle de la molécule individuelle et en temps réel. L'apport de ces techniques, permettra donc une meilleure compréhension des paramètres dynamiques des MAPs, de leurs effets sur la cinétique d'assemblage des MTs et de leur organisation.

In vivo, la localisation des *At*MAP65s a été analysée cependant les rôles qu'elles jouent dans la cellule n'ont pas pu être clairement défini. En effet, le modèle végétal *Arabidopsis* ne permet pas des modifications aisées de son génome à la différence d'autres organismes tels que les levures. Ainsi, nous disposons uniquement d'un mutant présentant un phénotype avéré pour *At*MAP65-3. Afin de localiser les *At*MAP65s *in vivo*, les chercheurs ont recouru à deux méthodes essentielles, l'immunocytochimie et l'expression des protéines fusionnées à une étiquette fluorescente. L'immunocytochimie peut s'avérer difficile à mettre en œuvre car il est difficile d'obtenir des anticorps polyclonaux spécifiques pour une *At*MAP65 donnée du fait de leurs homologies de séquences. Ainsi, au laboratoire, des anticorps polyclonaux dirigés contre

AtMAP65-4 ont été obtenus et même après épuisement contre trois *AtMAP65s* (*AtMAP65-1*, *AtMAP65-5* et *AtMAP65-8*), une réaction croisée avec des *AtMAP65s* persiste (analyse en western blot). De plus, la taille des cellules d'*Arabidopsis* est très petite, rendant l'observation détaillée des marquages au sein des fuseaux mitotiques délicate. L'expression d'*AtMAP65s* fluorescentes est une alternative avantageuse, bien qu'il faille contrôler qu'un fort niveau d'expression n'entraîne pas d'artéfacts de localisation. Pour palier à certaines limitations d'*Arabidopsis in planta*, l'usage des cellules de tabac BY-2 en culture permet notamment de faciliter l'observation du réseau de MTs, aussi ce type cellulaire nous rapproche des conditions d'observation que l'on peut avoir avec des cellules de mammifère en culture. Cependant, le génome de tabac est moins connu que celui d'*Arabidopsis*, et actuellement seule la séquence de *NtMAP65-1* est connue, ce qui pose de nouveau le problème de l'obtention d'anticorps fiables. Il sera donc important d'affiner les méthodes d'observation des *AtMAP65s* au cours du cycle cellulaire. Pour cela, l'expression de MAPs fusionnées à une protéine fluorescente et placées sous le contrôle de leurs promoteurs natifs doit être une solution. De plus, pour caractériser le rôle de chacune des *AtMAP65s*, des expériences d'interférence à l'ARN (ARNi) sont à envisager afin de mimer un phénotype de plantes KO difficile à obtenir chez *Arabidopsis* du fait de la présence de 9 isoformes d'*AtMAP65s*. Ces expériences d'ARNi ne sont pas envisageables pour le moment chez la lignée cellulaire BY-2 de tabac du fait de la méconnaissance de son génome.

En ce qui concerne la caractérisation d'*AtMAP65-4*, nos travaux démontrent sa localisation avec les MTs des fibres kinétochoriennes de la prométaphase jusqu'à l'anaphase. *In vitro*, nous avons montré qu'*AtMAP65-4* induit la formation de faisceaux de MTs en formant des associations latérales entre MTs adjacents et ce, quelles que soient leurs polarités. Nous avons montré que la dynamique d'association d'*AtMAP65-4* est concomitante de l'élongation du faisceau de MTs. De plus, la présence d'*AtMAP65-4* module les paramètres d'instabilité dynamique des MTs au sein des faisceaux essentiellement en diminuant la fréquence des événements de catastrophe et en favorisant la fréquence des événements de sauvetage. L'ensemble de ces données nous a permis de formuler l'hypothèse qu'*AtMAP65-4* formerait des associations latérales entre les MTs kinétochoriens dans les cellules. Ceci suggère qu'*AtMAP65-4* participerait dans un premier temps au maintien de la cohésion de cette population de MTs pendant leur croissance. Dans un second temps, en présence de partenaires protéiques ou à la suite d'une modification post traductionnelle, un détachement d'*AtMAP65-4* pourrait participer à la dépolymérisation régulière des MTs des fibres durant l'anaphase permettant la migration des chromatides sœurs vers les pôles. Cette fonction *in vivo*

d'*AtMAP65-4* n'a pas pu être étudiée plus en avant par l'analyse des plantes mutées KO insertionnel *AtMAP65-4* car nous n'avons pas observé de phénotype distinctif ni à l'échelle de la plante, ni à l'échelle de la cellule. Etant donné le rôle vital joué par les fibres kinétochoriennes, leur fonctionnement doit être très contrôlé. La famille des MAP65s d'*Arabidopsis* comporte 9 membres alors que chez d'autres espèces seul un membre a été identifié. Nous pouvons donc formuler l'hypothèse selon laquelle une autre *AtMAP65* pourrait compenser la perte de fonction d'*AtMAP65-4*. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure le fait que d'autres MAPs, n'appartenant pas à la famille des MAP65, et associées aux fibres kinétochoriennes, compensent la perte d'*AtMAP65-4*. Les expériences d'ARNi devraient nous permettre de préciser la fonction d'*AtMAP65-4*.

Il sera important également d'étudier les mécanismes impliqués dans la régulation de son activité. En particulier, la liaison directe d'*AtAurora* avec *AtMAP65-4* *in vivo* devra être recherchée (e.g. expériences d'immunoprécipitation) puis il sera très intéressant d'étudier l'état de phosphorylation d'*AtMAP65-4* au cours du cycle cellulaire. En effet, nous pensons que la phosphorylation peut être un moyen de diminuer l'activité de liaison d'*AtMAP65-4* aux MTs et permettre, avec des protéines partenaires, une dépolymérisation synchrone et régulière des fibres kinétochoriennes lors de la montée des chromatides aux pôles.

A l'échelle moléculaire quel est le rôle joué par *AtMAP65-4* ? Nous avons vu que la MAP modifie l'organisation et les paramètres cinétiques d'assemblage des MTs, notamment en diminuant les longueurs des dépolymérisations et en incitant les événements de repolymérisation. L'ensemble des données expérimentales suggèrent qu'*AtMAP65-4* permettrait de jouer le rôle d'une agrafe qui bloquerait la dépolymérisation. La modélisation *in silico* de l'activité d'*AtMAP65-4* et *AtMAP65-1* (cf Chapitre III) dans les conditions de nos essais biomimétiques, nous a permis de renforcer cette hypothèse. Ce travail suggère notamment une probabilité de détachement d'*AtMAP65-4* lors de la dépolymérisation d'un MT. Ainsi une MAP peut être « dégrafée », mais lorsque la densité de MAP est grande, alors la dépolymérisation a de fortes chances d'être stoppée. Ce modèle tridimensionnel nous a également montré que le nombre de MTs voisins et leur polarité influencent fortement la dynamique de polymérisation d'un MT donné. Aussi, afin de compléter ce travail, l'observation de faisceaux de MTs en trois dimensions constitue un défi à relever afin de mieux comprendre le mécanisme de liaison de la MAP avec les MTs.

Matériels et méthodes

1. Production d'*AtMAP65-4* recombinante et sa purification

1.1 Transformation et culture de bactéries

Les bactéries compétentes *Escherichia coli* Rosetta Blue sont transformées par le plasmide d'expression contenant l'ADNc de la protéine d'intérêt. La sélection des bactéries transformées se réalise par étalement des transformants sur milieu gélosé sélectif placé à 37 °C pendant la nuit. Une préculture de 50 ml de milieu LB (Luria Bertani : 10 g.l⁻¹ bactotryptone, 5 g.l⁻¹ extrait de levure, 10 g.l⁻¹ NaCl ; pour obtenir un milieu solide on rajoute de l'agar 15 g.l⁻¹) supplémenté d'antibiotiques estensemencée à partir d'un clone résistant. Les bactéries sont alors cultivées pendant la nuit, à 37 °C sous agitation. Une culture de 2 L de milieu TB (Terrific Broth : 12 g.l⁻¹ digestion pancréatique de caséine, 24 g.l⁻¹ extrait de levure, 9,4 g.l⁻¹ K₂HPO₄, 2,2 g.l⁻¹ KH₂PO₄) estensemencée au 1/40^e à partir de la préculture. Lorsque la culture atteint une DO₆₀₀ = 0,4 (densité optique lue à $\lambda=600$ nm) la température de la culture est abaissée à 22 °C puis la surproduction des protéines d'intérêt est induite avec 0,5 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) quand la DO₆₀₀ atteint 0,6. Après 20h de culture à 22 °C, les bactéries sont sédimentées par centrifugation à 6200 g pendant 30 min à 4 °C, les culots de bactéries sont ensuite gardés à -20 °C.

1.2 Purification de protéines recombinantes par chromatographie d'affinité

A mon arrivée au laboratoire, seule la forme *AtMAP65-4* pleine longueur avait été exprimée et purifiée. Après 20h de culture, les bactéries sont centrifugées à 6200 g pendant 30 min à 4 °C. Les culots sont ensuite repris à 0 °C dans du tampon de lyse (50 mM NaPi pH8, 200 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 0,5% Triton[®]-100, 30 mM imidazole, cocktail antiprotéases Roche©) puis les cellules sont cassées par ultrasons 3x 2 min. Le lysat est clarifié par centrifugation 30 min, 4°C à 30 000 g et le surnageant correspondant à la fraction soluble des

protéines est mélangé à une matrice de billes de sépharose recouvertes de nickel (Ni Sepharose™, GE health care) pendant 2 h à 4°C sous agitation. Les protéines recombinantes étant fusionnées à 2 étiquettes constituées chacune de 6 histidines à leur extrémité C- et N-terminale, elles vont interagir avec le nickel. Après centrifugation à 100 g pendant 2 min à 4 °C, les billes sont récupérées dans 5ml de tampon de lavage (50 mM NaPi pH8, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 120 mM imidazole) et incluses dans une colonne. Les billes sont ensuite lavées avec 80 ml de tampon de lavage afin d'éliminer les protéines liées de manière non-spécifique. Les protéines recombinantes sont éluées avec 10 ml de tampon d'éluion (50 mM NaPi pH8, 100 mM NaCl, 0,5m M DTT, 500 mM imidazole). La concentration protéique des fractions éluées (0,5ml) est mesurée par dosage de Bradford. La fraction contenant les protéines d'intérêt est ensuite dialysée pendant la nuit pour éliminer l'imidazole (tampon de dialyse : 50 mM NaPi pH8, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT). Une ultracentrifugation à 135 000 g pendant 30 min à 4 °C permet ensuite d'éliminer les protéines agrégées. Une étape supplémentaire de purification est réalisée par chromatographie d'exclusion (colonne Superdex 10/300 équilibrée dans le tampon de dialyse) pour éliminer les protéines contaminantes. Les protéines purifiées sont dosées par test de Bradford et sont stockées dans 10% de glycérol à -80 °C après congélation dans l'azote liquide. NB : GFP-*At*MAP65-4 est purifiée de manière identique à His-*At*MAP65-4-His mais dans des tampons différents (tampon de lyse : 50 mM NaPi pH8, 200 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 0,5% Triton®-100, 5 mM imidazole, cocktail antiprotéases Roche® ; tampon de lavage : 50 mM NaPi pH8, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 30mM imidazole ; tampon d'éluion : 50 mM NaPi pH8, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 500 mM imidazole).

1.3 Contrôle de la purification par SDS-PAGE

Les échantillons protéiques prélevés au cours de la purification sont dénaturés 5 min à 100 °C dans du tampon de charge (12,5 mM Tris pH6,8, 10% glycérol, 0,4% SDS, 0,01% Bleu de bromophénol, 25 mM DTT). L'électrophorèse est réalisée en gel de polyacrylamide 12% dénaturant, dans du tampon de migration Laemmli (192 mM glycine, 0,1% SDS, 25 mM Tris pH8,6) à 100 V, (Laemmli, 1970). Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie (40% éthanol, 10% acide acétique, 0,15% Bleu de Coomassie R250, 0,15% Bleu de Coomassie G250). Le gel est ensuite décoloré dans du tampon de décoloration (30% éthanol, 10% acide acétique).

2. Tests d'activité d'*At*MAP65-4 *in vitro*

2.1 Cosédimentation des MTs avec *At*MAP65-4 à forte vitesse

Un test *in vitro* de cosédimentation à forte vitesse entre *At*MAP65-4 (ou l'un de ses domaines) et des MTs préformés permet de déterminer si *At*MAP65-4 se lie aux MTs. Lors de ce test, les MTs (5 μ M) et *At*MAP65-4 (ou ses domaines) (1 μ M) sont incubés 15 min à température ambiante dans 1/3 de tampon d'*At*MAP65-4 (50 mM NaPi pH8, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT) et 2/3 de tampon BRB pour éviter l'agrégation des protéines. Ensuite, les MTs sont sédimentés à 135 000 g pendant 20 min. Puis les protéines du culot et du surnageant sont analysées par SDS-PAGE et western-blot.

2.2 Cosédimentation des MTs avec *At*MAP65-4 à faible vitesse

La capacité de formation de faisceaux de MTs d'*At*MAP65-4 (ou de ses domaines) est testée par cosédimentation à faible vitesse. Après incubation d'*At*MAP65-4 (4 μ M) avec des MTs préformés (5 μ M) pendant 15 min à température ambiante, les MTs organisés en faisceaux sont sédimentés à 4000 g pendant 5 min alors que dans ces conditions les MTs individuels restent dans le surnageant. Ensuite les protéines du culot et du surnageant sont analysées par SDS-PAGE.

2.3 Observation en microscopie à épifluorescence de MTs et *At*MAP65-4

Après incubation pendant 15 min à température ambiante de MTs marqués à la rhodamine (0,5 μ M) en présence d'*At*MAP65-4 ou de ses différents domaines (0,1 à 0,5 μ M), les protéines sont fixées par une solution contenant du glutaraldéhyde (10% glycérol, 0,1% glutaraldéhyde, 1 mM GTP dans du BRB). Ensuite l'échantillon est centrifugé (30 min à 24 000 g) sur lamelle à travers un coussin de glycérol (25% glycérol dans du BRB). Les lamelles sont lavées dans du TBS (« Tris Buffer Saline ») 2x10 min. Elles sont déposées sur une lame dans une goutte de milieu de montage (pour 100 ml : 11 g Mowiol Calbiochem[®], 27,5 g glycérol, 27,5 ml H₂O, Tris 0,2 M pH8,5 qsp 100 ml) contenant 10% de DABCO (1,4-Diazalbicyclo-{2.2.2}Octane) qui diminue l'extinction de la fluorescence. L'observation des

MTs est réalisée au microscope à épifluorescence avec le filtre DsRed (ZEISS® Axioplan 2, objectifs à immersion à huile 40x et 63x). Ce test a également été réalisé avec GFP-AtMAP65-4 de manière à localiser la protéine par rapport aux faisceaux de MTs à l'aide du filtre GFP. Les acquisitions ont été réalisées grâce au logiciel Metaview®.

3. Suivi de cinétique de polymérisation de la tubuline en présence de MAP par TIRFm

3.1 Préparation du mélange de tubulines nécessaire à la préparation d'amorces

Une solution de tubuline (BRB 1x, tubuline cyclée 11 μ M, tubuline TAMRA 8 μ M, tubuline biotine 5 μ M, GMPCPP 0,5 mM, DTT 1mM) est incubée 10 min dans la glace avant sa centrifugation pendant 15 min à 135 000 g à 4 °C. Le surnageant est ensuite réparti en nombre égal de tubes de 5 μ l et 9 μ l avant congélation instantanée dans l'azote liquide puis stockage à -80 °C.

3.2 Polymérisation d'amorces de microtubule GMPCPP

L'utilisation de tubuline fluorescente nécessite de protéger les solutions de la lumière afin d'éviter son photoblanchiment. Une première étape, consiste en la décongélation de 5 μ l de mélange d'amorce dans la glace avant une dilution au 20^e dans du BRB-DTT 1 mM. La solution de tubuline est placée pendant 45 min à 37 °C puis stockées à température ambiante. La seconde étape consiste à l'élongation des très courtes amorces générées lors de la première étape. La décongélation d'un aliquote de 9 μ l de mélange de préparation d'amorce est suivie de sa dilution au 9^e dans du BRB-DTT 1mM. La solution est pré incubée 20 s à 37 °C avant l'addition des 8 μ l de courtes amorces obtenues après la première étape. Ensuite, l'élongation des amorces de MTs se réalise au bain marie pendant 1h30 à 37°C. Les amorces générées se gardent à température ambiante pendant environ 2 jours (*attention au froid*).

3.3 Préparation de solutions spécifiques à l'observation en TIRFm

Des solutions de glucose à 15 mg/ml, de catalase à 1 mg/ml et de glucose oxydase à 5 mg/ml sont préparées par dilution dans de l'eau avant filtration sur membrane 0,45 μ m, puis préparation d'aliquotes de 10 μ l. Les échantillons sont stockés à -20 °C et il est à noter qu'il est important de ne pas les décongeler – recongeler plus d'une fois après utilisation.

Des aliquotes de 500 µl contenant une solution d'avidine à 1 mg/ml final diluée dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) sont préparés puis à stockés à -20 °C. Après décongélation, un aliquote d'avidine peut être placé à 4 °C en vue d'une utilisation ultérieure.

Une solution d'albumine de serum bovin ou BSA (Sigma A-7030) est préparée à 10% (p/v) dans de l'eau avant la préparation d'aliquotes stockés à -20 °C. Enfin, une solution de méthylcellulose (Sigma M-0387) à 2 % (p/v) placée à température ambiante sera utilisable pendant 2 semaines.

3.4 Protocole préparatoire à l'observation d'une cinétique de polymérisation de tubuline en présence de MAP par microscopie à onde évanescente (TIRFm)

L'observation de la polymérisation de MTs en microscopie à onde évanescente répond à un protocole précis, il faut donc être méticuleux et respecter l'ordre des étapes suivantes. En premier lieu, la plateforme d'observation TIRF est allumée au minimum 20 min avant le début de l'observation. La platine chauffante est réglée à 35 °C et les solutions de GTP 0,1 M, DTT 0,1 M, DTT 1 M, BRB20x, TpMAP10x, BSA 10% sont rassemblées puis stockées dans la glace excepté le TpMAP10x qui se stocke à température ambiante. Après décongélation, les aliquotes de glucose, catalase et glucose oxydase sont utilisés pour la préparation d'un cocktail anti photoblanchiment (20 µl final avec 1,6 µl glucose à 15 mg/ml, 1,6 µl catalase à 1 mg/ml, 1,6 µl glucose oxydase à 5 mg/ml, 4,0 µl DTT à 1M, 6,0 µl TpMAP10x et 5,2 µl eau). Des solutions de TpMAP1x (1ml, à garder à température ambiante) et de BRB-DTT (100 µl final avec 5 µl BRB20x, 1 µl DTT 0,1 M et 95 µl eau) sont préparées avant stockage dans la glace pendant la journée. Ensuite, les échantillons de tubuline cyclée et tubuline marquée sont placés dans la glace pour une décongélation lente et à l'abri de la lumière. Les solutions de tubuline sont à utiliser dans les 2 h .

Un jeu de lames et lamelles siliconnées est nettoyé par rinçages successifs à l'éthanol – eau puis séché sous air comprimé. Afin de préparer une surface d'adhésion pour les amorces de MTs, 5 µl d'avidine à 1mg/ml sont disposés au centre d'une bande de parafilm (15 x 3 cm) puis recouvert par une lamelle sans piéger de bulle d'air. L'incubation de l'avidine s'effectue pendant environ 15 min soit le temps de préparation des autres mélange. En fin d'incubation, l'excédent d'avidine est enlevé grâce à deux lavages : 2 gouttes de 10 µl d'eau sont disposées sur une bande de parafilm avant l'application de la lamelle et son détachement suivis de l'absorption du liquide par contact entre la tranche de la lamelle et du papier absorbant.

Le milieu réactionnel contenant la tubuline et la MAP s'obtient à la suite de deux étapes : dans un premier temps, une solution contenant 0,1 µM final d'*At*MAP65- est préparée 4 (4 µl

BSA 10%, 4 µl cocktail anti photoblanchiment, 4 µl BRB-DTT, 2 µl méthylcellulose 0,4% et 5µl de la dilution appropriée de MAP dans du tampon MAP). Après incubation 10 s au bain marie à 37°C, 1 µl d'amorces de MT GMPCPP sont ajoutées (cf. paragraphe précédent), ceci constitue le mélange1 qui est incubé 10 min à température ambiante. Dans une seconde étape, la préparation du mélange2 doit permettre l'élongation des courts faisceaux d'amorces de 10 µl du mélange1. Une solution de 5 µl contenant de la tubuline fluorescente et *At*MAP65-4 est préparée (22 µM tubuline cyclée, 3 µM tubuline Alexa, 1 mM GTP, *At*MAP65-4 0,1-0,5 µM pour un volume réactionnel de 15 µl final, Tp MAP / BRB-DTT qsq 5µl) et placée dans la glace.

5 µl de mélange2 sont réchauffés pendant 10 s au bain marie à 37 °C avant l'ajout de 10 µl de mélange1. A partir de cet instant, les conditions de polymérisation deviennent favorables à l'élongation des faisceaux d'amorce. 5 µl du mélange réactionnel sont rapidement déposés sur la lamelle qui est alors retournée sur une lame siliconée avant observation.

4. Test de phosphorylation d'*At*MAP65-4 par les kinases *At*Auroras

4.1 Purification des kinases Auroras d'*Arabidopsis*

Après transformation par choc thermique de 100 µl de bactéries compétentes (BL21 DE3 codon start) avec 50 ng d'ADN, les bactéries sont étalées sur milieu sélectif gélosé (LB Agar, 4 % (p/v) glucose). Après une incubation à 37 °C pendant 14 h, les colonies sont récupérées puis resuspendues dans 500 ml de milieu LB complémenté en antibiotique avant d'incuber à 37 °C sous agitation (190 rpm). Lorsque la DO₆₀₀ atteint 1 la préculture est diluée dans 5 L de milieu frais puis incubée à 37 °C sous agitation (190 rpm). L'expression de la kinase est induite lorsque la DO₆₀₀ atteint 0,7 par l'ajout 1 mM IPTG. Les cultures sont alors placées à 12 °C sous agitation ralentie (145 rpm) pendant 20 heures. Les bactéries sont culotées par centrifugation à 5000 g, pendant 15 min à 4 °C. Le culot est resuspendu à froid dans 60 ml de tampon de lyse (100 mM Tris HCl pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazole, 10 % Glycerol, 2.5 mM β-mercaptoethanol) complémenté de 2 pastilles d'un cocktail antiprotéases sans EDTA. Ensuite, une étape de sonication à froid en procédant par pulses de 30 s force 7 provoque l'éclatement des bactéries. Le surnageant de l'échantillon est récupéré puis centrifugé à 50000 g pendant 30 min à 4 °C.

Une solution de 1 ml de billes d'agarose recouvertes de nickel est rincée 3 fois par resuspension dans du tampon de lyse puis en les culotant par centrifugation à 100 g. Le mélange billes d'agarose et surnageant est incubé pendant 1 h sous agitation à 4 °C, puis les

billes sont disposées sur colonne. Un premier rinçage est effectué avec 2 volumes de colonne du premier tampon de lavage (50 mM Tris HCl pH 8, 1 M NaCl, 20 mM Imidazole, 10 % Glycerol) puis avec 2 volumes de colonne du second tampon de lavage (50 mM Tris HCl pH 8, 250 M NaCl, 20 mM Imidazole, 10 % Glycerol). L'élution de la fraction contenant les protéines d'intérêt se réalise avec le tampon d'élution (50 mM Tris HCl pH 8, 250 M NaCl, 250 mM Imidazole). Les fractions les plus concentrées (test de Bradford) sont rassemblées et 0,5 mM EDTA et 10 mM DTT sont ajoutés. Une étape de concentration sur membrane (kit Vivaspin6[®]) peut s'avérer nécessaire afin d'obtenir un volume final compris entre 0,5 et 1 ml. La dernière étape de purification des kinases consiste en une chromatographie par gel d'exclusion (Superdex 200). Après équilibrage de la colonne avec 50 ml de tampon d'équilibre (20 mM Tris HCl pH 8, 150 M NaCl, 5 mM DTT) en respectant un débit de 0,5 ml/min, l'échantillon concentré est injecté. Des fractions de 0,5-1 ml sont récupérées puis celles correspondant à la kinase et dépourvues de contaminants sont rassemblées (contrôle par SDS-PAGE). Une étape de concentration permet d'obtenir une concentration de l'ordre de 10 – 20 mg/ml avant l'ajout de 50% de glycérol. Les aliquotes sont conservés à -80°C après congélation dans l'azote liquide.

4.2 Test de phosphorylation d'*At*MAP65-4 par les Auroras

Les kinases Aurora A et B phosphorylent avec une grande efficacité l'histone H3 (H3) *in vitro*, c'est donc ce substrat qui est utilisé comme contrôle pour tester l'activité des kinases purifiées. Un mélange de 30 µl final (qsp eau) contenant H3 (0,75 µg), *At*Aurora 1 ou 2 (0,5 µg), du β-glycérophosphate (5 mM final), de l'ATP (0,1 mM final) et du γ-ATP (0,5 µl à 10 mCi.ml⁻¹) dans du tampon kinase (50 mM Tris pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM Na-Fluoride, 0,05 mM Na-orthovanadate) est incubé 1 h à 30 °C. Les protéines sont ensuite précipitées pendant 1 h à 4 °C avec de l'acide trichloroacétique (10 µl d'une solution à 80%) puis centrifugées à 24 000 g pendant 15 min à 4 °C. Les culots sont lavés avec 30 µl d'une solution d'acétone contenant 1 mM HCl puis par 30 µl d'acétone 100% avant d'être resuspendus dans 20 µl de tampon de charge 1x. Les échantillons sont ensuite analysés par SDS-PAGE. Le gel d'acrylamide est ensuite séché puis mis à développer pendant la nuit au contact d'un film phosphoré. Ce film détecte les électrons émis lors des désintégrations β dues à la radioactivité présente dans les protéines phosphorylées. Le film est ensuite numérisé grâce à un scanner (Typhoon[®]).

4.3 Caractérisation des sites de phosphorylation par spectrométrie de masse

Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec Michel Jacquinot du laboratoire EDyP (CEA Grenoble) dont l'équipe développe et déploie de méthodes analytiques dédiées à la caractérisation et à la quantification des modifications post traductionnelles.

5. Etude de la phosphorylation d'*At*MAP65-4 par les kinases *At*Auroras

5.1 Génération de mutants ponctuels par la méthode des amorces géantes

La méthode de mutation ponctuelle par la technique dite des amorces géantes ou « *megaprimers* » se réalise en 2 PCR consécutives. Lors d'une première PCR l'amorce géante est amplifiée : il s'agit d'un fragment d'ADN qui va s'hybrider sur environ 800 pb d'ADN matrice, il comportera à l'une de ces extrémités la mutation désirée. La deuxième PCR utilise l'amorce géante comme unique amorce et permet une amplification totale de l'ADN matrice à l'aide d'une polymérase fidèle. Le choix de l'emplacement de l'amorce géante est important, il est nécessaire de faire en sorte qu'il possède un site de restriction unique sur la matrice (et qui se trouvera dans la séquence de l'amorce géante). La digestion de ce site de restriction doit faire apparaître des extrémités cohésives et le site doit être inactivable à l'aide du fragment de Klenow (5' sortant). Pour exemple, le site de coupure BamHI correspond à ces critères. Une fois la position de l'amorce géante dessinée, il faut créer une version mutée du plasmide matrice. Le site de restriction précédemment choisi doit être inactivé grâce au fragment de Klenov. Ceci permettra de discriminer les clones mutés des non mutés. Les oligomères d'ADN pour réaliser les PCRs sont d'une taille d'environ 25 bases. La mutation doit être incluse au centre de l'oligomère et modifier au minimum la séquence matrice tout en évitant les codons rares. La première PCR se réalise sur 35 cycles dans un volume final de 50 µl et comporte 50 ng de matrice, 20 µM d'amorces, 10 µM de nucléotides et une ADN polymérase fidèle (type phusionTM). Pour récupérer suffisamment d'amorces géantes il est nécessaire de quadrupler la PCR. Après extraction, le fragment d'intérêt est élué dans 20 µl de tampon d'éluion. Quantifier la solution sur gel d'agarose 1% en déposant 1 et 2 µl d'ADN. La seconde PCR se réalise sur 20 cycles dans un volume final de 50 µl et comporte 75 ng de matrice (plasmide avec le site de restriction inactivé), 300 ng d'amorces géantes, 10 µM de nucléotides et une ADN polymérase extrêmement fidèle par (type Ex-taqTM). Attention, les quantités de matrice et amorce géante sont déterminantes ! Digérer le produit PCR avec 1 µl DpnI pendant 1 h à 37 °C afin d'éliminer l'ADN matrice méthylé puis inactiver l'enzyme en l'incubant 20 min à 80°C. Après transformation (ex : 3 µl ADN + 50 µl TOP-10 électro-

compétentes), les bactéries sont étalées sur milieu gélosé sélectif. La recherche de colonies possédant la mutation désirée se réalise par PCR sur colonies en utilisant les amorces utilisées pour générer l'amorce géante. La digestion du produit PCR par l'enzyme inactivée doit alors cliver le produit PCR si la colonie est positive. Procéder à des digestions contrôles sur 4 mini préparations issues de 4 clones positifs avant de séquencer 2 clones.

5.2 Obtention de la lignée Arabidopsis N555682 / *Atmap65-4* (At3g60840)

La recherche au sein des banques de mutants d'insertion d'ADN-T d'*Arabidopsis* à l'aide du logiciel FLAGdb (Samson *et al.*, 2002) a permis d'identifier un allèle *Atmap65-4* de la banque Salk (N555682, Alonso *et al.*, 2003) qui porte une insertion d'ADN-T dans le premier exon (Figure 21). Le site d'insertion d'ADN-T a été caractérisé par séquençage des régions génomiques flanquant l'ADN-T. L'analyse par RT-PCR des plantes homozygotes pour la mutation *Atmap65-4* a indiqué qu'aucun transcrit *AtMAP65-4* n'est produit. Une analyse par Western blot a révélé qu'aucune protéine correspondant à *AtMAP65-4* n'est produite dans les plants *AtMAP65-4* perte de fonction.

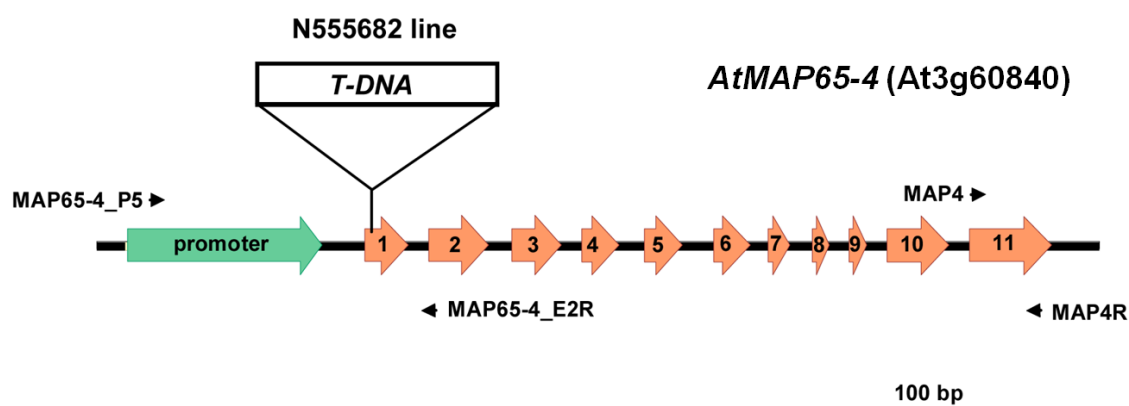


Figure 21 : Analyse du site d'insertion de l'ADN-T dans le locus *AtMAP65-4* (At3g60840).

5.3 Analyse du site d'insertion de l'ADN-T et isolement des plantes homozygotes *AtMAP65-4*

Afin d'isoler les plantes homozygotes *Atmap65-4 - Atmap65-4*, l'équipe de Bruno Favery (Sophia Antipolis) a analysé la ségrégation du marqueur kanamycine porté par l'ADN-T sur la descendance découlant de 20 plantes étudiées. Des descendantes de plantes ségréguées furent à 100% résistantes à la kanamycine, ce qui indique qu'elles étaient homozygotes pour l'allèle étiqueté par l'ADN-T. Pour confirmer ces résultats, des expériences de PCR ont été réalisées

avec les amorces MAP65-4_P5 (5'-ATG CAT GGA TCA GTT CAA AGT C -3 ') et MAP65-4_E2R (5'-CAA GTT TTC TCC TAA GCT CCT GTT -3') qui couvrent le site d'insertion d'ADN-T, et une troisième amorce LBb1 (5'-GCG TGG GCT CAC TGC TGC AAC T-3 ') spécifique pour la séquence de la bordure gauche de l'ADN-T. Lorsque l'ADN génomique provenant de plantes homozygotes *AtMAP65-4 - AtMAP65-4* a été utilisé comme matrice, aucune amplification n'a été obtenue avec les amorces d'*AtMAP65-4* qui entourent l'ADN-T. Lorsque l'ADN génomique d'une plante hétérozygote ou de type sauvage (WT) a été utilisé comme matrice, un produit de PCR 1184 pb a été obtenu avec les amorces d'*AtMAP65-4*. Un fragment d'ADN de 1160 pb a été obtenu lors de PCR réalisée sur *AtMAP65-4* à partir d'amplifications avec LBb1 et MAP65-4_P5. L'analyse phénotypique des plantes homozygotes *Atmap65-4 - Atmap65-4* a été effectuée en comparaison avec des plantes de type sauvage de la même origine génétique (Col0). L'analyse par RT-PCR a été réalisée en utilisant MAP4 (5'-CTC AAA AGA TGG GCT TCC TC -3 ') et MAP4R (5'-TCT CTT CTC AGC CAC AGG A -3) amorces. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Bruno Favery.

5.4 Obtention de plant d'*Arabidopsis AtMAP65-4* exprimant la tubuline GFP

Des plants d'*Arabidopsis* homozygotes KO insertionnels nous ont été donnés par Bruno Favery. Après croisement de ses plantes avec des plantes homozygotes exprimant la tubuline GFP, la génération F1 possède un génotype 100% hémizygote pour le KO insertionnel et pour l'expression de la tubuline. Pour visualiser les réseaux de MTs nous pouvons nous contenter d'une seule copie du gène de la tubuline GFP, par contre nous devons impérativement conserver le caractère homozygote du KO insertionnel. Après autopolinisation des plantes de la génération F1, la ségrégation Mendélienne nous indique que seuls 3/16 des plantules sont homozygotes KO insertionnel et au minimum hémizygote pour l'expression de la tubuline GFP. L'utilisation de milieux sélectifs lors de la germination contenant de l'hygromycine permet de valider la présence du transgène responsable du KO. De plus, nous éliminons les plantules dont la tubuline n'émet aucune fluorescence sous observation de la GFP. Enfin nous avons procédé au génotypage des plantules par PCR afin de sélectionner celles homozygotes KO insertionnel. Lors de cette étape, 3 amorces sont utilisées : 2 amorces s'hybridant le long d'*AtMAP65-4* permettant l'amplification d'un fragment de 1000 pb et une amorce s'hybridant sur l'ADN-T et pouvant amplifier un fragment de 800 pb en association avec une des amorces *AtMAP65-4*. Ainsi, en utilisant ces amorces, la PCR réalisée sur l'ADN génomique d'un clone sauvage amplifiera un fragment

de 1000 pb, contre 800 pb pour un clone homozygote *Atmap65-4* et les deux fragments dans le cas d'un clone hémizygote *Atmap65-4*.

5.5 Supplémentation de plant d'*Arabidopsis AtMAP65-4*

La supplémentation de plantes KO insertionnel pour *AtMAP65-4* est réalisé par agroinfiltration grâce à la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Le transgène ADN-T a été modifié de façon à porter une construction contenant *AtMAP65-4* fusionné à la mCherry est placée sous le contrôle de son promoteur endogène (Figure 22).

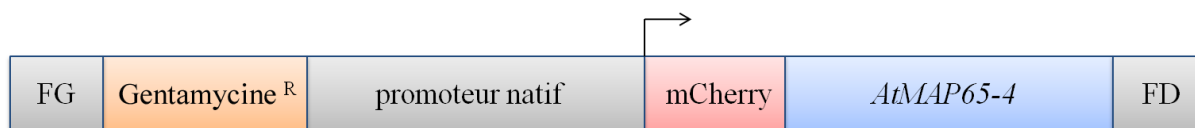


Figure 22: Schéma de l'ADN-T transfecté à *Arabidopsis* lors de l'agroinfiltration par *Agrobacterium tumefaciens*. Entre les cassettes de recombinaison FG (frontière gauche) et FD (frontière droite) sont insérés un gène de résistance à l'antibiotique gentamycine, ainsi que l'ADNc codant pour *AtMAP65-4* fusionné à la mCherry et placé sous le contrôle de son promoteur natif.

L'agroinfiltration est réalisée sur des inflorescences de plantes en fleurs non encore ouverte. Après obtention des graines, les plantules portant le transgène sont sélectionnées lors de la germination sur milieu contenant de la gentamycine.

Références bibliographiques

- 1 - **Ahmad, F.J., Yu, W., McNally, F.J., and Baas, P.W.** (1999). An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron. *J Cell Biol* 145, 305-315.
- 2 - **Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., Drabek, K., Stepanova, T., Dortland, B., Verkerk, T., Vermeulen, W., Burgering, B.M., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F., *et al.*** (2001). Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* 104, 923-935.
- 3 - **Al-Bassam, J., Kim, H., Brouhard, G., van Oijen, A., Harrison, S.C., and Chang, F.** (2010). CLASP promotes microtubule rescue by recruiting tubulin dimers to the microtubule. *Dev Cell* 19, 245-258.
- 4 - **Allard, J.F., Wasteneys, G.O., and Cytrynbaum, E.N.** (2010). Mechanisms of self-organization of cortical microtubules in plants revealed by computational simulations. *Mol Biol Cell* 21, 278-286.
- 5 - **Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., *et al.*** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.
- 6 - **Ambrose, J.C., and Cyr, R.** (2007). The kinesin ATK5 functions in early spindle assembly in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 226-236.
- 7 - **Ambrose, J.C., Shoji, T., Kotzer, A.M., Pighin, J.A., and Wasteneys, G.O.** (2007). The *Arabidopsis* CLASP gene encodes a microtubule-associated protein involved in cell expansion and division. *Plant Cell* 19, 2763-2775.
- 8 - **Andrews, P.D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L., and Swedlow, J.R.** (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell* 6, 253-268.
- 9 - **Azimzadeh, J., Nacry, P., Christodoulidou, A., Drevensek, S., Camilleri, C., Amiour, N., Parcy, F., Pastuglia, M., and Bouchez, D.** (2008). *Arabidopsis* TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell* 20, 2146-2159.
- 10 - **Barton, D.A., Gardiner, J.C., and Overall, R.L.** (2009). Towards correlative imaging of plant cortical microtubule arrays: combining ultrastructure with real-time microtubule dynamics. *J Microsc* 235, 241-251.
- 11 - **Baskin, T.I., Beemster, G.T., Judy-March, J.E., and Marga, F.** (2004). Disorganization of cortical microtubules stimulates tangential expansion and reduces the uniformity of cellulose microfibril alignment among cells in the root of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135, 2279-2290.
- 12 - **Bayley, P.M., Sharma, K.K., and R., M.S., eds.** (1994). *Microtubule dynamics in vitro* (New York, Wiley-Liss Inc).
- 13 - **Bieling, P., Kandels-Lewis, S., Telley, I.A., van Dijk, J., Janke, C., and Surrey, T.** (2008). CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *J Cell Biol* 183, 1223-1233.

- 14 - **Bieling, P., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E.L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D., and Surrey, T.** (2007). Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* *450*, 1100-1105.
- 15 - **Bieling, P., Telley, I.A., and Surrey, T.** (2010). A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps. *Cell* *142*, 420-432.
- 16 - **Binarova, P., Cenklova, V., Prochazkova, J., Doskocilova, A., Volc, J., Vrlik, M., and Bogre, L.** (2006). Gamma-tubulin is essential for acentrosomal microtubule nucleation and coordination of late mitotic events in Arabidopsis. *Plant Cell* *18*, 1199-1212.
- 17 - **Bisgrove, S.R., Hable, W.E., and Kropf, D.L.** (2004). +TIPs and microtubule regulation. The beginning of the plus end in plants. *Plant Physiol* *136*, 3855-3863.
- 18 - **Bouquin, T., Mattsson, O., Naested, H., Foster, R., and Mundy, J.** (2003). The Arabidopsis lue1 mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth. *J Cell Sci* *116*, 791-801.
- 19 - **Burk, D.H., Liu, B., Zhong, R., Morrison, W.H., and Ye, Z.H.** (2001). A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell* *13*, 807-827.
- 20 - **Cai, G., Ovidi, E., Romagnoli, S., Vantard, M., Cresti, M., and Tiezzi, A.** (2005). Identification and characterization of plasma membrane proteins that bind to microtubules in pollen tubes and generative cells of tobacco. *Plant Cell Physiol* *46*, 563-578.
- 21 - **Caillaud, M.C., Lecomte, P., Jammes, F., Quentin, M., Pagnotta, S., Andrio, E., de Almeida Engler, J., Marfaing, N., Gounon, P., Abad, P., et al.** (2008). MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* *20*, 423-437.
- 22 - **Caillaud, M.C., Paganelli, L., Lecomte, P., Deslandes, L., Quentin, M., Pecrix, Y., Le Bris, M., Marfaing, N., Abad, P., and Favery, B.** (2009). Spindle assembly checkpoint protein dynamics reveal conserved and unsuspected roles in plant cell division. *PLoS One* *4*, e6757.
- 23 - **Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., and Bouchez, D.** (2002). The Arabidopsis TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell* *14*, 833-845.
- 24 - **Carmena, M., and Earnshaw, W.C.** (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 842-854.
- 25 - **Carpenter, J.L., Ploense, S.E., Snustad, D.P., and Silflow, C.D.** (1992). Preferential expression of an alpha-tubulin gene of Arabidopsis in pollen. *Plant Cell* *4*, 557-571.
- 26 - **Chan, J., Calder, G., Fox, S., and Lloyd, C.** (2005). Localization of the microtubule end binding protein EB1 reveals alternative pathways of spindle development in Arabidopsis suspension cells. *Plant Cell* *17*, 1737-1748.
- 27 - **Chan, J., Jensen, C.G., Jensen, L.C., Bush, M., and Lloyd, C.W.** (1999). The 65-kDa carrot microtubule-associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 14931-14936.
- 28 - **Chan, J., Sambade, A., Calder, G., and Lloyd, C.** (2009). Arabidopsis cortical microtubules are initiated along, as well as branching from, existing microtubules. *Plant Cell* *21*, 2298-2306.
- 29 - **Chang-Jie, J., and Sonobe, S.** (1993). Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher-plant microtubule-associated protein. *J Cell Sci* *105* (Pt 4), 891-901.
- 30 - **Charrasse, S., Lorca, T., Doree, M., and Larroque, C.** (2000). The Xenopus XMAP215 and its human homologue TOG proteins interact with cyclin B1 to target p34cdc2 to microtubules during mitosis. *Exp Cell Res* *254*, 249-256.
- 31 - **Chretien, D., Fuller, S.D., and Karsenti, E.** (1995). Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J Cell Biol* *129*, 1311-1328.

- 32 - **Chretien, D., Metoz, F., Verde, F., Karsenti, E., and Wade, R.H.** (1992). Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules. *J Cell Biol* *117*, 1031-1040.
- 33 - **Chuong, S.D., Good, A.G., Taylor, G.J., Freeman, M.C., Moorhead, G.B., and Muench, D.G.** (2004). Large-scale identification of tubulin-binding proteins provides insight on subcellular trafficking, metabolic channeling, and signaling in plant cells. *Mol Cell Proteomics* *3*, 970-983.
- 34 - **Cleveland, D.W.** (1989). Autoregulated control of tubulin synthesis in animal cells. *Curr Opin Cell Biol* *1*, 10-14.
- 35 - **Cleveland, D.W., and Havercroft, J.C.** (1983). Is apparent autoregulatory control of tubulin synthesis nontranscriptionally regulated? *J Cell Biol* *97*, 919-924.
- 36 - **Demidov, D., Van Damme, D., Geelen, D., Blattner, F.R., and Houben, A.** (2005). Identification and dynamics of two classes of aurora-like kinases in Arabidopsis and other plants. *Plant Cell* *17*, 836-848.
- 37 - **Dhonukshe, P., Vischer, N., and Gadella, T.W., Jr.** (2006). Contribution of microtubule growth polarity and flux to spindle assembly and functioning in plant cells. *J Cell Sci* *119*, 3193-3205.
- 38 - **Dixit, R., and Cyr, R.** (2004). Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modifications of microtubule behavior. *Plant Cell* *16*, 3274-3284.
- 39 - **Dunn, S., Morrison, E.E., Liverpool, T.B., Molina-Paris, C., Cross, R.A., Alonso, M.C., and Peckham, M.** (2008). Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J Cell Sci* *121*, 1085-1095.
- 40 - **Dustin, P., ed.** (1984). *Microtubules* (Heidelberg, Springer-Verlag).
- 41 - **Dutcher, S.K.** (2001). The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 49-54.
- 42 - **Erickson, H.P.** (1974). Microtubule surface lattice and subunit structure and observations on reassembly. *J Cell Biol* *60*, 153-167.
- 43 - **Erickson, H.P., and O'Brien, E.T.** (1992). Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *21*, 145-166.
- 44 - **Euteneuer, U., and McIntosh, J.R.** (1981). Structural polarity of kinetochore microtubules in PtK1 cells. *J Cell Biol* *89*, 338-345.
- 45 - **Fache, V., Gaillard, J., Van Damme, D., Geelen, D., Neumann, E., Stoppin-Mellet, V., and Vantard, M.** (2010). Arabidopsis Kinetochore Fiber-Associated MAP65-4 Cross-Links Microtubules and Promotes Microtubule Bundle Elongation. *Plant Cell*.
- 46 - **Fourest-Lieuvin, A., Peris, L., Gache, V., Garcia-Saez, I., Juillan-Binard, C., Lantez, V., and Job, D.** (2006). Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell* *17*, 1041-1050.
- 47 - **Gaillard, J., Neumann, E., Van Damme, D., Stoppin-Mellet, V., Ebel, C., Barbier, E., Geelen, D., and Vantard, M.** (2008). Two microtubule-associated proteins of Arabidopsis MAP65s promote antiparallel microtubule bundling. *Mol Biol Cell* *19*, 4534-4544.
- 48 - **Gonzalez-Garay, M.L., and Cabral, F.** (1995). Overexpression of an epitope-tagged beta-tubulin in Chinese hamster ovary cells causes an increase in endogenous alpha-tubulin synthesis. *Cell Motil Cytoskeleton* *31*, 259-272.
- 49 - **Gruss, O.J., and Vernos, I.** (2004). The mechanism of spindle assembly: functions of Ran and its target TPX2. *J Cell Biol* *166*, 949-955.
- 50 - **Hamada, T., Itoh, T.J., Hashimoto, T., Shimmen, T., and Sonobe, S.** (2009). GTP is required for the microtubule catastrophe-inducing activity of MAP200, a tobacco homolog of XMAP215. *Plant Physiol* *151*, 1823-1830.

- 51 - **Hammond, J.W., Cai, D., and Verhey, K.J.** (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* 20, 71-76.
- 52 - **Hardham, A.R., and Gunning, B.E.** (1978). Structure of cortical microtubule arrays in plant cells. *J Cell Biol* 77, 14-34.
- 53 - **Hartman, J.J., and Vale, R.D.** (1999). Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin. *Science* 286, 782-785.
- 54 - **Hayashi, T., Sano, T., Kutsuna, N., Kumagai-Sano, F., and Hasezawa, S.** (2007). Contribution of anaphase B to chromosome separation in higher plant cells estimated by image processing. *Plant Cell Physiol* 48, 1509-1513.
- 55 - **Horio, T., and Hotani, H.** (1986). Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* 321, 605-607.
- 56 - **Howard, J., and Hyman, A.A.** (2007). Microtubule polymerases and depolymerases. *Curr Opin Cell Biol* 19, 31-35.
- 57 - **Hussey, P.J., Hawkins, T.J., Igarashi, H., Kaloriti, D., and Smertenko, A.** (2002). The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol Biol* 50, 915-924.
- 58 - **Hussey, P.J., Lloyd, C.W., and Gull, K.** (1988). Differential and developmental expression of beta-tubulins in a higher plant. *J Biol Chem* 263, 5474-5479.
- 59 - **Hyman, A.A., Salser, S., Drechsel, D.N., Unwin, N., and Mitchison, T.J.** (1992). Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell* 3, 1155-1167.
- 60 - **Igarashi, H., Orii, H., Mori, H., Shimmen, T., and Sonobe, S.** (2000). Isolation of a novel 190 kDa protein from tobacco BY-2 cells: possible involvement in the interaction between actin filaments and microtubules. *Plant Cell Physiol* 41, 920-931.
- 61 - **Job, D., Valiron, O., and Oakley, B.** (2003). Microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol* 15, 111-117.
- 62 - **Kakimoto, T., and Shibaoka, H.** (1988). Cytoskeletal ultrastructure of phragmoplast-nuclei complex isolated from cultured tobacco cells. *Protoplasma* 2, 95-103.
- 63 - **Katsuki, M., Drummond, D.R., Osei, M., and Cross, R.A.** (2009). Mal3 masks catastrophe events in *Schizosaccharomyces pombe* microtubules by inhibiting shrinkage and promoting rescue. *J Biol Chem* 284, 29246-29250.
- 64 - **Kawamura, E., Himmelsbach, R., Rashbrooke, M.C., Whittington, A.T., Gale, K.R., Collings, D.A., and Wasteneys, G.O.** (2006). MICROTUBULE ORGANIZATION 1 regulates structure and function of microtubule arrays during mitosis and cytokinesis in the *Arabidopsis* root. *Plant Physiol* 140, 102-114.
- 65 - **Kawamura, E., and Wasteneys, G.O.** (2008). MOR1, the *Arabidopsis thaliana* homologue of *Xenopus* MAP215, promotes rapid growth and shrinkage, and suppresses the pausing of microtubules in vivo. *J Cell Sci* 121, 4114-4123.
- 66 - **Keller, P.J., Pampaloni, F., Lattanzi, G., and Stelzer, E.H.** (2008). Three-dimensional microtubule behavior in *Xenopus* egg extracts reveals four dynamic states and state-dependent elastic properties. *Biophys J* 95, 1474-1486.
- 67 - **Khmelniskii, A., Roostalu, J., Roque, H., Antony, C., and Schiebel, E.** (2009). Phosphorylation-dependent protein interactions at the spindle midzone mediate cell cycle regulation of spindle elongation. *Dev Cell* 17, 244-256.
- 68 - **Kikkawa, M., Ishikawa, T., Nakata, T., Wakabayashi, T., and Hirokawa, N.** (1994). Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 127, 1965-1971.
- 69 - **Kirik, V., Herrmann, U., Parupalli, C., Sedbrook, J.C., Ehrhardt, D.W., and Hulskamp, M.** (2007). CLASP localizes in two discrete patterns on cortical microtubules and

is required for cell morphogenesis and cell division in Arabidopsis. *J Cell Sci* 120, 4416-4425.

70 - **Kirschner, M.W., Honig, L.S., and Williams, R.C.** (1975). Quantitative electron microscopy of microtubule assembly in vitro. *J Mol Biol* 99, 263-276.

71 - **Kitamura, E., Tanaka, K., Komoto, S., Kitamura, Y., Antony, C., and Tanaka, T.U.** (2010). Kinetochore generate microtubules with distal plus ends: their roles and limited lifetime in mitosis. *Dev Cell* 18, 248-259.

72 - **Kong, Z., Hotta, T., Lee, Y.R., Horio, T., and Liu, B.** (2010). The γ -tubulin complex protein GCP4 is required for organizing functional microtubule arrays in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 22, 191-204.

73 - **Korolev, A.V., Buschmann, H., Doonan, J.H., and Lloyd, C.W.** (2007). AtMAP70-5, a divergent member of the MAP70 family of microtubule-associated proteins, is required for anisotropic cell growth in Arabidopsis. *J Cell Sci* 120, 2241-2247.

74 - **Korolev, A.V., Chan, J., Naldrett, M.J., Doonan, J.H., and Lloyd, C.W.** (2005). Identification of a novel family of 70 kDa microtubule-associated proteins in Arabidopsis cells. *Plant J* 42, 547-555.

75 - **Kueh, H.Y., and Mitchison, T.J.** (2009). Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics. *Science* 325, 960-963.

76 - **Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

77 - **Lafanechere, L., and Job, D.** (2000). The third tubulin pool. *Neurochem Res* 25, 11-18.

78 - **Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., et al.** (2004). A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* 167, 19-22.

79 - **Lee, Y.R., and Liu, B.** (2004). Cytoskeletal motors in Arabidopsis. Sixty-one kinesins and seventeen myosins. *Plant Physiol* 136, 3877-3883.

80 - **Li, H., Zeng, X., Liu, Z.Q., Meng, Q.T., Yuan, M., and Mao, T.L.** (2009). Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-2 acts as a microtubule stabilizer. *Plant Mol Biol* 69, 313-324.

81 - **Linding, R., Jensen, L.J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T.J., and Russell, R.B.** (2003). Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure* 11, 1453-1459.

82 - **Linse, K., and Mandelkow, E.M.** (1988). The GTP-binding peptide of beta-tubulin. Localization by direct photoaffinity labeling and comparison with nucleotide-binding proteins. *J Biol Chem* 263, 15205-15210.

83 - **Liu, B., Joshi, H.C., Wilson, T.J., Silflow, C.D., Palevitz, B.A., and Snustad, D.P.** (1994). γ -Tubulin in Arabidopsis: gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell* 6, 303-314.

84 - **Liu, B., Marc, J., Joshi, H.C., and Palevitz, B.A.** (1993). A γ -tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* 104 (Pt 4), 1217-1228.

85 - **Lloyd, C., and Chan, J.** (2004). Microtubules and the shape of plants to come. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 13-22.

86 - **Lowe, J., and Amos, L.A.** (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* 391, 203-206.

87 - **Maiato, H., Rieder, C.L., and Khodjakov, A.** (2004). Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J Cell Biol* 167, 831-840.

88 - **Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E.** (1985). Unstained microtubules studied by cryo-electron microscopy. Substructure, supertwist and disassembly. *J Mol Biol* 181, 123-135.

- 89 - **Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., and Milligan, R.A.** (1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol* 114, 977-991.
- 90 - **Mao, G., Chan, J., Calder, G., Doonan, J.H., and Lloyd, C.W.** (2005a). Modulated targeting of GFP-AtMAP65-1 to central spindle microtubules during division. *Plant J* 43, 469-478.
- 91 - **Mao, T., Jin, L., Li, H., Liu, B., and Yuan, M.** (2005b). Two microtubule-associated proteins of the Arabidopsis MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiol* 138, 654-662.
- 92 - **Margolis, R.L.** (1981). Role of GTP hydrolysis in microtubule treadmilling and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 1586-1590.
- 93 - **McEwen, B.F., Ding, Y., and Heagle, A.B.** (1998). Relevance of kinetochore size and microtubule-binding capacity for stable chromosome attachment during mitosis in PtK1 cells. *Chromosome Res* 6, 123-132.
- 94 - **McNally, K.P., Bazirgan, O.A., and McNally, F.J.** (2000). Two domains of p80 katanin regulate microtubule severing and spindle pole targeting by p60 katanin. *J Cell Sci* 113 (Pt 9), 1623-1633.
- 95 - **Meier, I., and Brkljacic, J.** (2009). Adding pieces to the puzzling plant nuclear envelope. *Curr Opin Plant Biol* 12, 752-759.
- 96 - **Melki, R., and Carlier, M.F.** (1993). Thermodynamics of tubulin polymerization into zinc sheets: assembly is not regulated by GTP hydrolysis. *Biochemistry* 32, 3405-3413.
- 97 - **Menges, M., de Jager, S.M., Gruissem, W., and Murray, J.A.** (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* 41, 546-566.
- 98 - **Metoz, F., Arnal, I., and Wade, R.H.** (1997). Tomography without tilt: three-dimensional imaging of microtubule/motor complexes. *J Struct Biol* 118, 159-168.
- 99 - **Mitchison, T., and Kirschner, M.** (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242.
- 100 - **Mitchison, T.J.** (1993). Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* 261, 1044-1047.
- 101 - **Mitchison, T.J., and Kirschner, M.W.** (1985). Properties of the kinetochore in vitro. II. Microtubule capture and ATP-dependent translocation. *J Cell Biol* 101, 766-777.
- 102 - **Mollinari, C., Kleman, J.P., Jiang, W., Schoehn, G., Hunter, T., and Margolis, R.L.** (2002). PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol* 157, 1175-1186.
- 103 - **Muller, S., Wright, A.J., and Smith, L.G.** (2009). Division plane control in plants: new players in the band. *Trends Cell Biol* 19, 180-188.
- 104 - **Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T.I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T., and Hasebe, M.** (2005). Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nat Cell Biol* 7, 961-968.
- 105 - **Murata, T., Tanahashi, T., Nishiyama, T., Yamaguchi, K., and Hasebe, M.** (2007). How do Plants Organize Microtubules Without a Centrosome? *journal of integrative plant biology* 49, 1154-1163.
- 106 - **Musacchio, A., and Salmon, E.D.** (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 379-393.
- 107 - **Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L.A., and Lowe, J.** (1998a). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol* 5, 451-458.
- 108 - **Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H.** (1998b). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199-203.

- 109 - **Oakley, B.R., Oakley, C.E., Yoon, Y., and Jung, M.K.** (1990). Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* *61*, 1289-1301.
- 110 - **Pantaloni, D., and Carlier, M.F.** (1986). Involvement of guanosine triphosphate (GTP) hydrolysis in the mechanism of tubulin polymerization: regulation of microtubule dynamics at steady state by a GTP cap. *Ann N Y Acad Sci* *466*, 496-509.
- 111 - **Paredes, A.R., Somerville, C.R., and Ehrhardt, D.W.** (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* *312*, 1491-1495.
- 112 - **Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechere, L., Brocard, J., Moore, A.T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L., and Andrieux, A.** (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol* *185*, 1159-1166.
- 113 - **Perrin, R.M., Wang, Y., Yuen, C.Y., Will, J., and Masson, P.H.** (2007). WVD2 is a novel microtubule-associated protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* *49*, 961-971.
- 114 - **Pesquet, E., Korolev, A.V., Calder, G., and Lloyd, C.W.** (2010). The Microtubule-Associated Protein AtMAP70-5 Regulates Secondary Wall Patterning in *Arabidopsis* Wood Cells. *Curr Biol*.
- 115 - **Peters, J.M.** (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 644-656.
- 116 - **Raff, E.C.**, ed. (1994). The role of multiple tubulin isoforms in cellular microtubule function. (New York).
- 117 - **Raff, E.C., Fackenthal, J.D., Hutchens, J.A., Hoyle, H.D., and Turner, F.R.** (1997). Microtubule architecture specified by a beta-tubulin isoform. *Science* *275*, 70-73.
- 118 - **Raynaud-Messina, B., and Merdes, A.** (2007). Gamma-tubulin complexes and microtubule organization. *Curr Opin Cell Biol* *19*, 24-30.
- 119 - **Receveur-Brechot, V., Bourhis, J.M., Uversky, V.N., Canard, B., and Longhi, S.** (2006). Assessing protein disorder and induced folding. *Proteins* *62*, 24-45.
- 120 - **Rodionov, V.I., and Borisy, G.G.** (1997). Microtubule treadmilling in vivo. *Science* *275*, 215-218.
- 121 - **Roll-Mecak, A., and McNally, F.J.** (2010). Microtubule-severing enzymes. *Curr Opin Cell Biol* *22*, 96-103.
- 122 - **Samson, F., Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B., Lepiniec, L., Pelletier, G., Caboche, M., and Lecharny, A.** (2002). FLAGdb/FST: a database of mapped flanking insertion sites (FSTs) of *Arabidopsis thaliana* T-DNA transformants. *Nucleic Acids Res* *30*, 94-97.
- 123 - **Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Sonobe, S., Igarashi, H., Itoh, T.J., Hidaka, M., and Machida, Y.** (2006). Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes Dev* *20*, 1004-1014.
- 124 - **Schatz, P.J., Solomon, F., and Botstein, D.** (1986). Genetically essential and nonessential alpha-tubulin genes specify functionally interchangeable proteins. *Mol Cell Biol* *6*, 3722-3733.
- 125 - **Schuyler, S.C., Liu, J.Y., and Pellman, D.** (2003). The molecular function of Aselp: evidence for a MAP-dependent midzone-specific spindle matrix. Microtubule-associated proteins. *J Cell Biol* *160*, 517-528.
- 126 - **Sedbrook, J.C., Ehrhardt, D.W., Fisher, S.E., Scheible, W.R., and Somerville, C.R.** (2004). The *Arabidopsis* sku6/spiral1 gene encodes a plus end-localized microtubule-interacting protein involved in directional cell expansion. *Plant Cell* *16*, 1506-1520.
- 127 - **Shaw, S.L., Kamyar, R., and Ehrhardt, D.W.** (2003). Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science* *300*, 1715-1718.

- 128 - **Smertenko, A., Saleh, N., Igarashi, H., Mori, H., Hauser-Hahn, I., Jiang, C.J., Sonobe, S., Lloyd, C.W., and Hussey, P.J.** (2000). A new class of microtubule-associated proteins in plants. *Nat Cell Biol* 2, 750-753.
- 129 - **Smertenko, A.P., Chang, H.Y., Sonobe, S., Fenyk, S.I., Weingartner, M., Bogre, L., and Hussey, P.J.** (2006). Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *J Cell Sci* 119, 3227-3237.
- 130 - **Smertenko, A.P., Chang, H.Y., Wagner, V., Kaloriti, D., Fenyk, S., Sonobe, S., Lloyd, C., Hauser, M.T., and Hussey, P.J.** (2004). The Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell* 16, 2035-2047.
- 131 - **Smertenko, A.P., Kaloriti, D., Chang, H.Y., Fiserova, J., Opatrny, Z., and Hussey, P.J.** (2008). The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of Arabidopsis microtubule-associated protein MAP65 isoforms. *Plant Cell* 20, 3346-3358.
- 132 - **Smirnova, E.A., Reddy, A.S., Bowser, J., and Bajer, A.S.** (1998). Minus end-directed kinesin-like motor protein, Kcbp, localizes to anaphase spindle poles in *Haemanthus endosperm*. *Cell Motil Cytoskeleton* 41, 271-280.
- 133 - **Sonobe, S., Yamamoto, S., Motomura, M., and Shimmen, T.** (2001). Isolation of cortical MTs from tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 42, 162-169.
- 134 - **Stoppin-Mellet, V., Gaillard, J., and Vantard, M.** (2002). Functional evidence for in vitro microtubule severing by the plant katanin homologue. *Biochem J* 365, 337-342.
- 135 - **Stoppin-Mellet, V., Gaillard, J., and Vantard, M.** (2006). Katanin's severing activity favors bundling of cortical microtubules in plants. *Plant J* 46, 1009-1017.
- 136 - **Stoppin, V., Vantard, M., Schmit, A.C., and Lambert, A.M.** (1994). Isolated Plant Nuclei Nucleate Microtubule Assembly: The Nuclear Surface in Higher Plants Has Centrosome-like Activity. *Plant Cell* 6, 1099-1106.
- 137 - **Subramanian, R., Wilson-Kubalek, E.M., Arthur, C.P., Bick, M.J., Campbell, E.A., Darst, S.A., Milligan, R.A., and Kapoor, T.M.** (2010). Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein. *Cell* 142, 433-443.
- 138 - **Szymanski, D.** (2002). Tubulin folding cofactors: half a dozen for a dimer. *Curr Biol* 12, R767-769.
- 139 - **Traas, J., Bellini, C., Nacry, P., Kronenberger, J., Bouchez, D., and Caboche, M.** (1995). Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature* 375, 676-677.
- 140 - **Valiron, O., Arnal, I., Caudron, N., and Job, D.** (2010). GDP-tubulin incorporation into growing microtubules modulates polymer stability. *J Biol Chem* 285, 17507-17513.
- 141 - **Van Damme, D., Bouget, F.Y., Van Poucke, K., Inze, D., and Geelen, D.** (2004a). Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins. *Plant J* 40, 386-398.
- 142 - **Van Damme, D., Van Poucke, K., Boutant, E., Ritzenthaler, C., Inze, D., and Geelen, D.** (2004b). In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol* 136, 3956-3967.
- 143 - **Vantard, M., Levilliers, N., Hill, A.M., Adoutte, A., and Lambert, A.M.** (1990). Incorporation of *Paramecium* axonemal tubulin into higher plant cells reveals functional sites of microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8825-8829.
- 144 - **Vasquez, R.J., Gard, D.L., and Cassimeris, L.** (1999). Phosphorylation by CDK1 regulates XMAP215 function in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton* 43, 310-321.
- 145 - **Venier, P., Maggs, A.C., Carlier, M.F., and Pantaloni, D.** (1994). Analysis of microtubule rigidity using hydrodynamic flow and thermal fluctuations. *J Biol Chem* 269, 13353-13360.

- 146 - **Verhey, K.J., and Gaertig, J.** (2007). The tubulin code. *Cell Cycle* 6, 2152-2160.
- 147 - **Verni, F., Somma, M.P., Gunsalus, K.C., Bonaccorsi, S., Belloni, G., Goldberg, M.L., and Gatti, M.** (2004). Feo, the Drosophila homolog of PRC1, is required for central-spindle formation and cytokinesis. *Curr Biol* 14, 1569-1575.
- 148 - **Vinogradova, M.V., Reddy, V.S., Reddy, A.S., Sablin, E.P., and Fletterick, R.J.** (2004). Crystal structure of kinesin regulated by Ca(2+)-calmodulin. *J Biol Chem* 279, 23504-23509.
- 149 - **Vitre, B., Coquelle, F.M., Heichette, C., Garnier, C., Chretien, D., and Arnal, I.** (2008). EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nat Cell Biol* 10, 415-421.
- 150 - **Vos, J.W., Pieuchot, L., Evrard, J.L., Janski, N., Bergdoll, M., de Ronde, D., Perez, L.H., Sardon, T., Vernos, I., and Schmit, A.C.** (2008). The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. *Plant Cell* 20, 2783-2797.
- 151 - **Voter, W.A., O'Brien, E.T., and Erickson, H.P.** (1991). Dilution-induced disassembly of microtubules: relation to dynamic instability and the GTP cap. *Cell Motil Cytoskeleton* 18, 55-62.
- 152 - **Walker, R.A., O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A., Erickson, H.P., and Salmon, E.D.** (1988). Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol* 107, 1437-1448.
- 153 - **Walker, R.A., Pryer, N.K., and Salmon, E.D.** (1991). Dilution of individual microtubules observed in real time in vitro: evidence that cap size is small and independent of elongation rate. *J Cell Biol* 114, 73-81.
- 154 - **Wang, X., Zhu, L., Liu, B., Wang, C., Jin, L., Zhao, Q., and Yuan, M.** (2007). Arabidopsis MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN18 functions in directional cell growth by destabilizing cortical microtubules. *Plant Cell* 19, 877-889.
- 155 - **Wasteney, G.O.** (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J Cell Sci* 115, 1345-1354.
- 156 - **Wasteney, G.O., and Ambrose, J.C.** (2009). Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol* 19, 62-71.
- 157 - **Wegner, A.** (1976). Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* 108, 139-150.
- 158 - **Westermann, S., and Weber, K.** (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 938-947.
- 159 - **Whitfield, C., Abraham, I., Ascherman, D., and Gottesman, M.M.** (1986). Transfer and amplification of a mutant beta-tubulin gene results in colcemid dependence: use of the transformant to demonstrate regulation of beta-tubulin subunit levels by protein degradation. *Mol Cell Biol* 6, 1422-1429.
- 160 - **Whittington, A.T., Vugrek, O., Wei, K.J., Hasenbein, N.G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M.C., and Wasteney, G.O.** (2001). MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* 411, 610-613.
- 161 - **Wicker-Planquart, C., Stoppin-Mellet, V., Blanchoin, L., and Vantard, M.** (2004). Interactions of tobacco microtubule-associated protein MAP65-1b with microtubules. *Plant J* 39, 126-134.
- 162 - **Wollman, R., Cytrynbaum, E.N., Jones, J.T., Meyer, T., Scholey, J.M., and Mogilner, A.** (2005). Efficient chromosome capture requires a bias in the 'search-and-capture' process during mitotic-spindle assembly. *Curr Biol* 15, 828-832.
- 163 - **Yao, M., Wakamatsu, Y., Itoh, T.J., Shoji, T., and Hashimoto, T.** (2008). Arabidopsis SPIRAL2 promotes uninterrupted microtubule growth by suppressing the pause state of microtubule dynamics. *J Cell Sci* 121, 2372-2381.

- 164 - **Yasuhara, H., Muraoka, M., Shogaki, H., Mori, H., and Sonobe, S.** (2002). TMBP200, a microtubule bundling polypeptide isolated from telophase tobacco BY-2 cells is a MOR1 homologue. *Plant Cell Physiol* *43*, 595-603.
- 165 - **Zhai, Y., Kronebusch, P.J., and Borisy, G.G.** (1995). Kinetochore microtubule dynamics and the metaphase-anaphase transition. *J Cell Biol* *131*, 721-734.
- 166 - **Zhu, C., and Jiang, W.** (2005). Cell cycle-dependent translocation of PRC1 on the spindle by Kif4 is essential for midzone formation and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 343-348.
- 167 - **Zhu, C., Lau, E., Schwarzenbacher, R., Bossy-Wetzel, E., and Jiang, W.** (2006). Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 6196-6201.

Annexes

Posters présentés lors participation à des congrès internationaux :

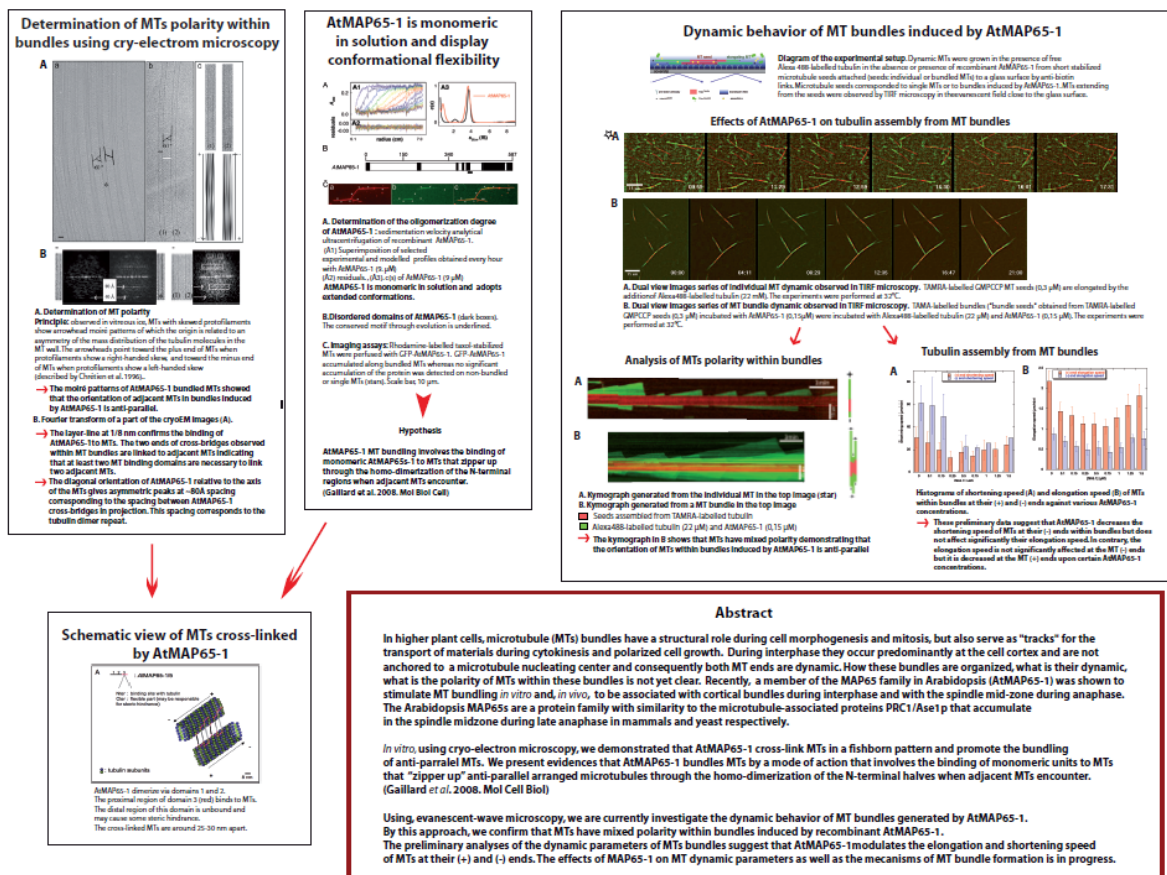
Microtubule Bundle Dynamics mediated by *Arabidopsis* MAP65-1 (AtMAP65-1)

V. Stoppin-Mellet¹, V. Fache¹, E. Neumann², J. Gaillard¹, C. Ebel², M. Vantard¹

¹. Institut de Recherches et Technologies pour le Vivant, F-38054 Grenoble Cedex 9, France ². Institut de Biologie Structurale, F-38054 Grenoble Cedex, France

These authors contributed equally to this work

email address : marylin.vantard@cea.fr

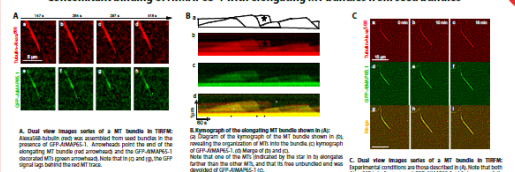


American Society for Cell Biology (ASCB), 2008 (San Francisco, USA)

INTRODUCTION

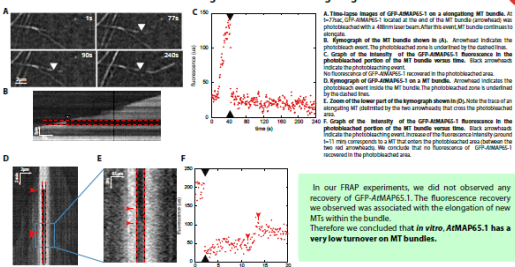
During interphase, plant microtubule (MT) arrays are self-organized as MT bundles highly dispersed within the cell cortex. How these MT bundles are generated and organized is still not well understood. Here, we studied, at the molecular level, MT bundle assembly and dynamics by AtMAP65-1, the plant homologue of yeast *Asp1* and mammals PRK1. Indeed, AtMAP65-1, which is a member of the MT-associated family MAP65s that comprises nine proteins in *Arabidopsis*, has been shown to co-localize with bundled cortical MT *in vivo* and to bundle MTs in an antiparallel orientation *in vitro*. Furthermore, we presented evidences for the binding of AtMAP65-1 as monomeric units to MTs that “zipper up” MTs through its homo-dimerization when adjacent MTs encounter (Galliard et al., 2008). Here we pursue our characterization of AtMAP65-1 by addressing two main questions : 1- How does AtMAP65-1 binds to MTs ? 2- How does AtMAP65-1 affect the dynamic of MTs within bundles ?

Concomitant binding of AtMAP65-1 with elongating MT bundles from seed bundles



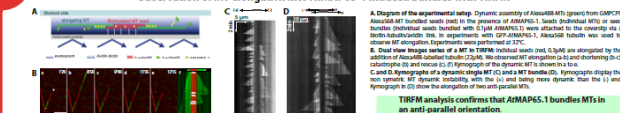
ArMAP65.1 binds along all MTs
ArMAP65.1 only colocalizes with bundled MTs
Binding of ArMAP65.1 to MTs is concomitant with MT elongation

Persistent binding of ArMAP65-1 to elongating MT bundles



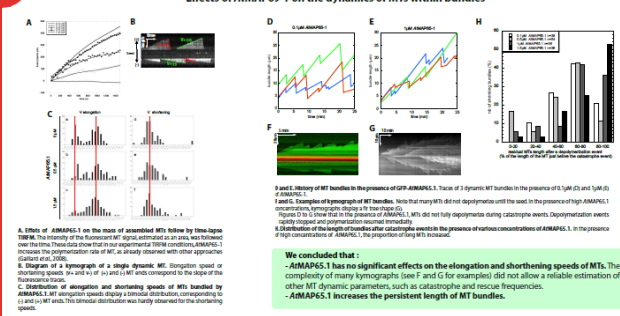
In our FRAP experiments, we did not observe any recovery of GFP-AtMAP65.1. The fluorescence recovery we observed was associated with the elongation of new MTs within the bundle. Therefore we concluded that *in vitro*, AtMAP65.1 has a very low turnover on MT bundles.

Observation of MT elongation into ArMAP65-1 Induced bundles with TIRFM



TIRFM analysis confirms that ArMAP65.1 bundles MTs in an anti-parallel orientation.

Effects of ArMAP65-1 on the dynamics of MTs within bundles



We concluded that :

- *AtMAP65.1* has no significant effects on the elongation and shortening speeds of MTs. The complexity of many kymographs (see F and G for examples) did not allow a reliable estimation of other MT dynamic parameters, such as catastrophe and rescue frequencies.
- *AtMAP65.1* increases the persistent length of MT bundles.

CONCLUSION

Using time lapse evanescent wave microscopy, we follow the behavior of individual microtubules within AIMP65-1 induced bundles, and evaluate some of the parameters that characterize MT dynamic.

We observed that AIMP65-1 persistently binds along elongating MTs to build anti-parallel bundles. MTs within bundles remain highly dynamic; AIMP65-1 has a higher residence time at plus ends than minus ends. The frequency of the kymographs in the presence of AIMP65-1 often indicate detailed tracking of individual MTs within bundles, preliminary results suggest that AIMP65-1 does not change catastrophe and rescue frequencies of MTs within bundles. The main effect of AIMP65-1 is to increase the persistence length of MTs within bundles, by decreasing the rate of depolymerization of MTs. How does AIMP65-1 induce bundling? We propose that AIMP65-1 induces bundling by increasing the persistence length of MTs, which would allow them to grow longer before reaching a critical length to limit the depolymerization rate of MTs. It has previously been pointed that Ase1p, the yeast fusion homolog of AIMP65-1, might also exert braking forces on elongating MTs (Janson et al., 2007). Further experiments have to be designed to address this issue.

To fully understand the function of AIMP65-1 in vivo, it will be essential to address other questions we will focus on: what are the mechanical properties of AIMP65-1 induced bundles? What is the role of AIMP65-1 in regulating the growth of microtubules? How do microtubule reorganization regulate cell migration?

Activities of *Arabidopsis* MAP65-4 on microtubule assembly

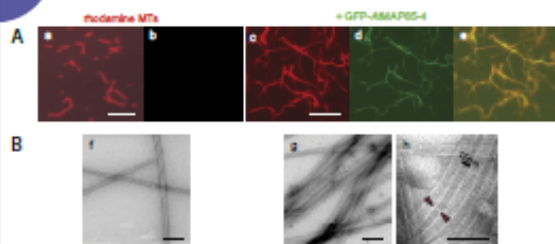
Vincent Fache¹, Jérémie Gaillard¹, Virginie Stoppin-Mellet¹, Emmanuelle Neumann², Marylin Vantard¹

¹ Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (IRTSV), UMR CNRS/CEA/INRA/Université Joseph Fourier 38054 Grenoble, France

² Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel (IBS), UMR CNRS/CEA, Université Joseph Fourier, 38027 Grenoble, France
mail: marylin.vantard@cea.fr

The *Arabidopsis* MAP65s compose a protein family sharing similarity with the microtubule-associated proteins PRCL/Asp1p that accumulate in the spindle midzone during late anaphase in mammals and yeast respectively. In *Arabidopsis*, nine AtMAP65 family members were identified (Hussey et al., 2002). Up to now, AtMAP65-1 and AtMAP65-5 are so far the most studied and were shown to promote MT bundling *in vitro*. *In vivo*, they co-localise with cortical microtubules (MTs). In interphase, with preprophase bands during the initiation of mitosis, the spindle midzone and the phragmoplast in late division (Gaillard et al., 2008). In comparison, AtMAP65-4 is co-localised only with the mitotic spindle until anaphase (Van Damme et al., 2004). On the basis of their diverse localisation patterns, we postulate that AtMAP65s exhibit differential molecular and functional properties which still remain to be identified. Our goal is to characterise AtMAP65-4 at the molecular and functional levels.

1 Effects of AtMAP65-4 on MTs organisation

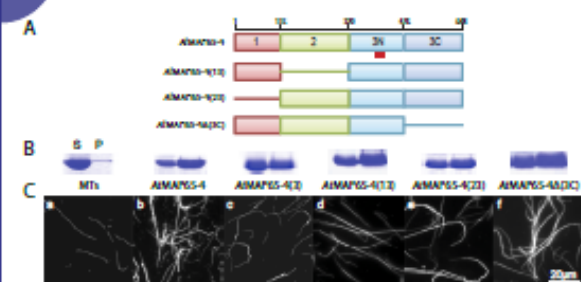


A Fluorescence microscopy: rhodamine-labelled taxol-stabilized MTs (0.5 μM) observed through rhodamine filter (a) and GFP filter (b). (c) With the addition of GFP-AtMAP65-4 (0.25 μM), the MTs are organized in bundles. AtMAP65-4 localises along MTs bundles (d) and merge (e). Scale bar 20 μm.

B Negative stain electron microscopy of MTs alone (f) or with AtMAP65-4 (g and h). Scale bar 100 nm.

► AtMAP65-4 binds along MTs and organises them into bundles. MTs within bundles are parallel, separated by 15 nm and AtMAP65-4 form an angle of 90° with MTs.

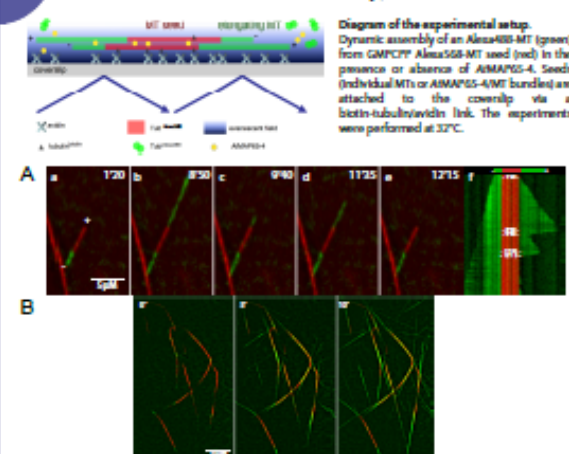
2 Identification of the MT bundling domains of AtMAP65-4



A Diagram of the AtMAP65-4 domains and their combinations. The conserved motif through evolution is underlined in red. Bundled MTs and individual MTs were separated by low speed centrifugation. AtMAP65-4 proteins at 5 μM were incubated with 1 μM of MTs. Pellets (P) and supernatants (S) were analysed by SDS-PAGE.

► The domains (1) and (2) are involved in MT bundling induce by AtMAP65-4 whereas the domain (3C) does not. The MT binding domain is in the domain (3N) (data not shown).

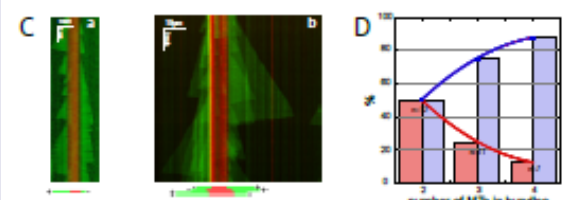
3 Evanescent-wave microscopy (TIRFM)



A Diagram of the experimental setup. Dynamic assembly of an Alexa488-MT (green) from GMPCPP. Alexa488-MT seed (red) in the presence or absence of AtMAP65-4. Seeds (individual MTs or AtMAP65-4-MT bundles) are attached to the coverslip via a biotin-tubulin/avidin link. The experiments were performed at 37°C.

B Dual view images series of a MT in TIRFM: seeds (red, 0.3 μM) are elongated by the addition of Alexa488-labelled tubulin (22 μM). We observed MT elongation (a-b) and shortening (b-c), catastrophe (b) and rescue (c).

C Dual view images series of MT bundles observed in TIRFM microscopy: seeds (red, 0.3 μM) were grown from the addition of Alexa488-labelled tubulin (22 μM) incubated with AtMAP65-4 (0.15 μM). After 10 min a dense network of MT bundles has assembled.

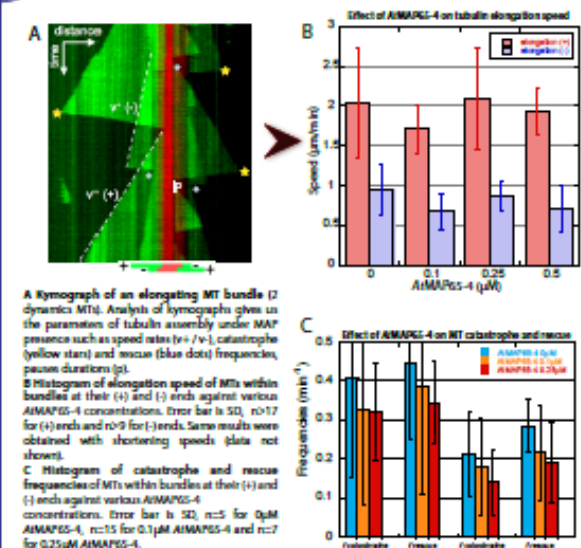


C Kymographs generated from an individual MT (a) and a MT bundle (b). Kymographs display the non symmetric MT dynamic instability: the (+) and (-) ends are more dynamic than the (+) end.

D Histogram of the polarity of MTs within bundles induced by AtMAP65-4. Bundles of 2, 3 or 4 MTs were analysed in order to determine if all MTs are in the same polarity (red bars) or not (blue bars). Results have to be compared with a random distribution of polarity of MTs in bundles (red and blue curves).

► The distribution of MT polarity in MT bundles induced by AtMAP65-4 is random.

4 Effects of AtMAP65-4 on the dynamic parameters of MTs within bundles



► AtMAP65-4 has no significant effect on MT growth and shortening speeds. AtMAP65-4 might stabilise MTs by decreasing catastrophe and rescue frequencies.

5 Perspectives

Knowing the *in vitro* properties of AtMAP65-4 we obtained, we will study the dynamic behavior *in vivo*. For this purpose, we will focused on the decorated AtMAP65-4/MTs (kinetochore MTs?). In *Arabidopsis* KO mutants expressing labelled AtMAP65-4 under the control of its own promotor and GFP labelled tubulin.

Résumé

AtMAP65-4 is a microtubule-associated protein belonging to the *AtMAP65s* family that comprises 9 members identified in *Arabidopsis thaliana*. These proteins belong to a family conserved during evolution, MAP65s. Thus, homologous proteins are present in mammals (PRC1), in yeast (Ase1p) or *Drosophila* (FEO). So far the study of the molecular properties and function of *AtMAP65s* has focused mainly on *AtMAP65-1* and *AtMAP65-5*. The main feature of these proteins is to induce the formation of microtubule bundles *in vitro*. *In vivo*, these *AtMAP65s* are localized with subsets of microtubule bundles as they are suggested to play a role in establishing and maintaining these networks. From the results we obtained on *AtMAP65-4* properties during this work such as the *in vivo* localization, biochemical properties and functional effect on the MT polymerization, we suggested that the *in vivo* function of *AtMAP65-4* is involved in setting up and maintaining microtubule bundles within kinetochore fibers during cell division. *In vitro* studies allowed us to show that *AtMAP65-4* changes the dynamic parameters of microtubule. In addition to its ability to form bundles, *AtMAP65-4* allows steady growth of microtubules in bundles it induces. The mechanism of action of the MAP at the molecular level was analyzed through a bioinformatic study in which we modeled the activity of *AtMAP65-4* and concluded that it could block the depolymerization events. Moreover, the activity of *AtMAP65-4* could be regulated *in vivo* by post-translational modifications. Indeed, we have shown that *AtMAP65-4* is phosphorylated by Aurora kinases *in vitro*. The effect of this phosphorylation during mitosis is under investigation.

AtMAP65-4 est une protéine associée aux microtubules appartenant à la famille des *AtMAP65s* qui compte 9 membres identifiés chez *Arabidopsis thaliana*. Ces protéines appartiennent à une famille conservée au cours de l'évolution, les MAP65s. Ainsi, des protéines homologues sont présentes chez de mammifères (PRC1), chez la levure (Ase1p) ou chez la drosophile (FEO). Jusqu'ici l'étude des propriétés moléculaires et fonctionnelles des *AtMAP65s* s'est portée essentiellement sur l'étude d'*AtMAP65-1* et *AtMAP65-5*. La principale caractéristique de ces protéines est d'induire la formation de faisceaux de microtubules *in vitro*. La distribution des *AtMAP65s* *in vivo* est très régulée, celles-ci sont localisées avec des réseaux des microtubules bien définis. Ainsi, leur rôle supposé est de mettre en place ces réseaux puis de participer à leur maintien. La localisation d'*AtMAP65-4* apparait comme très intéressante car elle est strictement associée avec les microtubules du fuseau mitotique. D'après les résultats obtenus au cours de ce travail, nous avons suggéré que la fonction *in vivo* d'*AtMAP65-4* est de participer à la mise en place et au maintien des microtubules en faisceaux dans les fibres kinétochoriennes lors de la division cellulaire. Lors d'une étude *in vitro* nous avons montré qu'*AtMAP65-4* modifie les paramètres dynamiques de polymérisation des microtubules. Outre sa capacité à former des faisceaux, *AtMAP65-4* permet une croissance régulière des microtubules au sein des faisceaux qu'elle induit. Le mécanisme d'action de la MAP à l'échelle moléculaire a été analysé à travers une étude bioinformatique où nous avons modélisé l'activité d'*AtMAP65-4*. Les données obtenues montrent qu'*AtMAP65-4* peut bloquer les événements de dépolymérisation des microtubules. Par ailleurs, l'activité d'*AtMAP65-4* pourrait être régulée *in vivo* par des modifications post traductionnelles. En effet, nous avons étudié l'effet de la phosphorylation d'*AtMAP65-4* par les kinases Auroras. Cette phosphorylation pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité d'*AtMAP65-4* au cours de la mitose.